

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-87299

(43)公開日 平成9年(1997)3月31日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C 07 K 16/40		C 07 K 16/40
C 07 H 21/04		C 07 H 21/04
C 12 N 5/10		C 12 P 21/08
15/02		C 12 Q 1/68
15/09	ZNA	G 01 N 33/574

審査請求 未請求 請求項の数16 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-200985	(71)出願人	390010205 富士薬品工業株式会社 富山県高岡市長慶寺530番地
(22)出願日	平成8年(1996)7月12日	(72)発明者	品川 朗 富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工 業株式会社内
(31)優先権主張番号	特願平7-200320	(72)発明者	清木 元治 石川県金沢市涌波3丁目10番14号
(32)優先日	平7(1995)7月14日	(72)発明者	佐藤 博 石川県金沢市平和町3丁目18番15号 平和 宿舎C57-11
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(74)代理人	弁理士 水野 昭宣

(54)【発明の名称】 MMP-2活性化因子に特異的なモノクローナル抗体

## (57)【要約】

【課題】 癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療に関わる研究に有用な診断手段に、さらにその他の医学的生理学的用途に有用な、新規なタンパク質に対する抗体、特にはモノクローナル抗体を提供する。

【解決手段】 ヒト癌細胞表層で特異的に発現している潜在型MMP-2の活性化能を有し且つMMPの一種であるMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子であるMT-MMP-3に特異的に結合するモノクローナル抗体、そのMT-MMP-3をコードする塩基配列を含有するDNA、該DNAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いる該マトリックスメタロプロテアーゼの製造方法、さらにはそれらタンパク質及び抗体の用途。

(2)

特開平9-87299

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種であり且つ MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である天然の MT-MMP と実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩に対する抗体。

【請求項 2】 MT-MMP-3 またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つものであるタンパク質に対する抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の抗体。

【請求項 3】 配列表の配列番号：2 で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有する MT-MMP-3 又はその塩であるタンパク質に対する抗体であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の抗体。

【請求項 4】 外因性 DNA 配列を原核生物において発現して得たものであるか、あるいは真核生物で発現させて得たものであるタンパク質に対する抗体であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか一記載の抗体。

【請求項 5】 配列表の配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか一記載の抗体。

【請求項 6】 タンパク質の部分ペプチド又はその塩に対する抗体であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか一記載の抗体。

【請求項 7】 抗血清であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか一記載の抗体。

【請求項 8】 モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか一記載の抗体。

【請求項 9】 MT-MMP-3 又はその塩に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1～6 及び 8 のいずれか一記載の抗体。

【請求項 10】 潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種であり且つ MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である天然の MT-MMP と実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を抗原として用い、それに対する抗体を得ることを特徴とする潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種であり且つ MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である天然の MT-MMP と実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体の製造方法。

【請求項 11】 潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種であり且つ MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である天然の MT-MMP と実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又

はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩で免疫した動物から得られた、潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種であり且つ MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である天然の MT-MMP と実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体を産生する細胞を、継代培養可能な細胞と融合せしめ、継代培養可能かつ MT-MMP-3 を包含するタンパク質に対する抗体を産生するハイブリッド細胞を選別することを特徴とする請求項 8 又は 9 記載の抗体の产生方法。

【請求項 12】 潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種であり且つ MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である天然の MT-MMP と実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を試薬として用いるか、あるいは請求項 1～9 のいずれか一記載の抗体を試薬として用いることを特徴とする MT-MMP-3 の検出・測定方法。

【請求項 13】 請求項 12 の MT-MMP-3 の検出・測定方法に用いる標識化された MT-MMP-3 に対する抗体。

【請求項 14】 請求項 12 の MT-MMP-3 の検出・測定方法に用いる潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種であり且つ MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である天然の MT-MMP と実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩であることを特徴とする標識化されたタンパク質あるいは部分ペプチド又はその塩。

【請求項 15】 MT-MMP-3 発現細胞あるいは組織の検出・測定方法に用いる潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種であり且つ MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である天然の MT-MMP と実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその部分ペプチドをコードすることを特徴とする標識化された核酸。

【請求項 16】 ハイブリダイゼーション・プローブであることを特徴とする請求項 15 記載の核酸。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療に関わる研究に有用な診断手段として、あるいはその他の医学的生理学的用途に有用な、新規なタンパク質及びそれをコードする遺伝子に関するものである。特に本発明は、潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種である MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である新規な膜結合型タンパク質及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに詳しくは、本発明はヒト癌細胞表層で特異的に発現している新規マトリックスメタロプロテアーゼ〔本發

(3)

特開平9-87299

3

明で明らかにされた新規マトリックスメタロプロテアーゼをMT-MMP-3 (Membrane-Type Matrix metalloproteinase-3)と命名する]、それをコードする塩基配列を含有するDNA、該DNAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いる該マトリックスメタロプロテアーゼの製造方法、該マトリックスメタロプロテアーゼタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体、さらにはそれらタンパク質及び抗体の用途に関するものである。

## 【0002】

【従来技術】原発巣組織内に存在する癌細胞が浸潤、転移するためには、その周囲に存在する細胞外マトリックスが、癌細胞の移動の障害になる。したがって、癌細胞が組織を浸潤し転移するには、原発巣からの遊離、周辺の細胞外マトリックスの破壊が必要となる。癌細胞の転移は、その後基底膜の破壊、血管への侵入、侵出、二次臓器への生着、増殖等の段階を経て成立する。癌細胞の転移の障壁となっている細胞外マトリックスは、IV型コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸等の複雑な成分から構成されているが、この細胞外マトリックスの分解には、基質特異性を異にするマトリックスメタロプロテアーゼ（以下MMPと略記する）と総称される一群の酵素が関与している。

【0003】これまでにMMPとして間質型コラゲナーゼ (MMP-1)、72kDa ゼラチナーゼ (IV型コラゲナーゼあるいはゼラチナーゼAともい：MMP-2)、92kDa ゼラチナーゼ (IV型コラゲナーゼあるいはゼラチナーゼBともい：MMP-9)、ストロムライシン-1 (MMP-3)、マトリライシン (MMP-7)、好中球コラゲナーゼ (MMP-8)、ストロムライシン-2 (MMP-10)、ストロムライシン-3 (MMP-11) 等が報告されている (Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 4:197~250, 1993)。これらのMMPはファミリーを形成し、遺伝子の一次構造は既に報告されている。これらのMMPのcDNAデータから推定されるアミノ酸配列には相同性が認められており、基本的に分泌産生時に除かれるN末端のシグナルペプチドに続き、プロペプチドドメイン、Zn<sup>2+</sup>結合触媒ドメイン、5~50アミノ酸よりなるプロリンに富んだヒンジドメイン、C-末端のヘモペキシン凝血酵素様ドメインから構成されている。MMP-7においてはヘモペキシン凝血酵素様ドメインはない。MMP-2とMMP-9では、この他にゼラチン結合ドメインを含んでいる。

【0004】これらのMMPのうち、基底膜の主要構造体であるIV型コラーゲンを主たる基質とするIV型コラゲナーゼ (MMP-2とMMP-9) は、高転移性の癌細胞における高い発現が数多く報告され、癌細胞の基底膜浸潤への関与が提唱されてきた (Cell., 6

-50-

4

4:327~336, 1991)。MMPの活性発現調節は、少なくとも転写レベル、酵素活性を示さない潜在型酵素から活性型酵素への活性化の段階、MMPの特異的阻害剤であるティッシュ インヒビター オブメタロプロテアーゼ (TIMP) による活性調節などといった段階で行われていると考えられている (Trends Genet., 6:121~125, 1990)。全てのMMPは不活性な潜在型として分泌されるが、In vitroの実験では、MMP-1、MMP-9の活性化は、プラスミン、トリプシン、カテーテンG等のセリンプロテアーゼによって生じることが示されており、さらに、MMP-9の活性化が活性型MMP-3の作用によっても引き起こされることが報告されている (J. Biol. Chem., 267:3581~3584, 1992)。しかしながら、MMP-2が上述のプロテアーゼの切断部位を持たないため、MMP-2の活性化は、これらによっては起こらないと考えられている (Curr. Opin. Cell Biol., 5:891~897, 1993)。

【0005】一方、これらのMMPは、必ずしも癌細胞だけから産生されている訳ではなく、周辺の線維芽細胞や炎症細胞からもそれぞれ異なるMMPが産生されていることも報告されている (Breast Cancer Res. Treat., 24:209~218, 1993. Curr. Opin. Cell Biol., 5:891~897, 1993)。中でもMMP-2は、組織構築の変化を伴うような様々な部位の線維芽細胞で発現しているが、正常組織と癌組織のMMP-2を比較するとその活性化が癌組織で特異的に生じていることが肺癌の例等で報告されている (Clin. Exp. Metastasis, 11:183~189, 1993)。MMP-9では、活性型が検出される頻度は低い。また、癌細胞の浸潤の先端 (invadopodia) で活性型MMP-2が局在することがIn vitroの実験系で示され、癌細胞浸潤における重要性が示唆されている (Cancer Res., 53:3159~3164, 1993. Breast Cancer Res. Treat., 53:3159~3164, 1994)。

【0006】この様な背景から、MMP-2の活性化機構が注目されてきたが、前述の様にMMP-1、MMP-9の活性化がトリプシンなどのセリンプロテアーゼで誘導されるのに対し、MMP-2の活性化機構は不明であり、特に活性化因子は同定されていなかった。MMP-2の産生細胞であるHT1080細胞をコンカナバリンAや12-o-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) で処理すると活性型MMP-2が培養上清に出現することが知られており、これらの細胞では、MMP-2の活性化因子が誘導されていると考えられる (J. Natl. Canc

-訂4-

(4)

特開平9-87299

5

r Inst. 85: 1758~1764, 1993. Clin. Exp. Metastasis., 11: 183~189, 1993). このMMP-2の活性化が細胞膜画分により誘導されること、キレート剤やTIMPによって活性化が抑制されることから、活性化因子は膜結合型のMMPの1種であることが想定された (J. Biol. Chem., 268: 14033~14039, 1993)。

【0007】本発明者らは、先に遺伝子工学的手法により新規なMMP遺伝子のクローニングを行い、C末端に典型的なトランスメンブレン・ドメインを持ち、MMP-2を活性化する新しいMMPをコードする遺伝子をクローニングした (Nature, 370: 61~65, 1994)。実際、この遺伝子を培養細胞で発現させると、その遺伝子産物は分泌されることなく細胞膜上に局在したことから、本発明者らはこういったMMPをMT-MMP (membrane-type MMP) と命名した。これまで述べてきたようにMMPとりわけMMP-2は、その活性型が癌細胞特異的に見出されことから、抗癌、癌などに対する抗転移薬の標的として益々認識されつつある。しかしながら、MMP-2は正常組織においても潜在型として比較的恒常に存在することから、活性発現調節は活性化酵素への活性化の過程にあり、その鍵を握る活性化因子の探索、同定は癌の診断、悪性度の判定マーカー及び癌などに対する抗転移薬剤の標的として極めて重要であるとすることができる。

【0008】また、アルツハイマー病の発症に関与する $\beta$ アミロイドタンパク質の切断におけるMMP-2の関与が指摘されている。 $\beta$ アミロイドタンパク質はアミロイドタンパク質前駆体の一部であり、 $\beta$ アミロイドタンパク質領域は、その1/4がアミロイドタンパク質前駆体の膜貫通領域に含まれ、残りは細胞外に出ている。最近、アミロイドタンパク質前駆体の複数の代謝が明らかにされたが、その一つは、 $\alpha$ セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼにより $\beta$ アミロイドタンパク質領域内を切断され、細胞外放出されるものである。最近、MMP-2に $\alpha$ セクレターゼ様の $\beta$ アミロイドタンパク質分解活性が見出され、MMP-2が $\alpha$ セクレターゼあるいは細胞外での $\beta$ アミロイドタンパク質分解酵素として機能している可能性が指摘されている (Nature, 362: 839, 1993)。 $\beta$ アミロイドタンパク質は、アルツハイマー病患者の脳で観察される老人斑の主成分であり、 $\beta$ アミロイドタンパク質の自己凝集と沈着により老人斑のコアを形成する。アルツハイマー病の患者の脳では $\beta$ アミロイドタンパク質分解酵素の機能低下が生じている可能性もあることからMMP-2が注目されているが、やはりその鍵を握るのはMMP-2の活性化の過程である。先に本発明者らが同定したMT-MMP (新たに、ここで「MT-MMP-1」と名付けられた) はMMP-2の活性化因子であると考えられるが、MT-M

50

6

MMP-1のような未知のMMPが存在することは、細胞外マトリックスには多様な構成成分が存在することからも充分に予想され、MT-MMP-1以外のMMP-2の活性化因子の存在も否定できない。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外であって潜在型MMP-2活性化能を有する潜在型MMP-2活性化因子である新規なタンパク質及びそれをコードする遺伝子、該潜在型MMP-2活性化因子である新規なタンパク質の製造方法及び該タンパク質及び該遺伝子の用途等を提供することを目的とする。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、潜在型MMP-2の活性化が癌細胞膜画分により誘導されること、キレート剤やTIMPによって活性化が抑制されることから活性化因子は膜結合型のMMPの1種であると想定されていることに着目し、先に潜在型MMP-2活性化能を有する新規なMMPをコードする遺伝子を単離したが、これ以外にもMMP-2の活性化因子として作用するMMPや生化学的に既知のMMPと異なるMMPが存在するのではないかと考え、遺伝子工学的手法を用い種々研究した結果、新たな潜在型MMP-2活性化能を有するMMPをコードする遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成させるに至った。

【0011】今まで、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPとしてMT-MMP-1が知られていたが、それ以外の潜在型MMP-2活性化因子については30同定されていなかった。本発明者により新規な潜在型MMP-2活性化因子たるMMPの遺伝子がクローニングされ、遺伝子塩基配列およびアミノ酸配列の全てが明らかにされるに至った。本発明者らは、この新規なMMPを当初MT-MMP-2と命名した(平成7年(1995年)7月14日に日本国に出願された特願平7-200319号並びに特願平7-200320号)が、ゴードンリサーチコンファレンス オン マトリックスメタロプロテアーゼズ (アンドーバーエヌエイチ 1995年7月16~21日) [Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases (Andover, NH July 16-21, 1995)]において、このものは新たに「MT-MMP-3」と呼ぶべきものとされ、そこに於いて「MT-MMP-3」と呼称するとの合意がなされた(ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry), Vol. 270, pp.230 13-23020 (1995))。したがって、本MT-MMP-3は、特願平7-200319号並びに特願平7-200320号に記載のMT-MMP-2と同一のものを指しているのである。

【0012】すなわち、本発明は新規なタンパク質、M

(5)

特開平9-87299

7

T-MMP-3及びその類縁体に関わるものである。さらに本発明は新規なMT-MMP-3の全体又は一部をコードするDNA配列、このようなDNA配列を有するベクター及びこのようないべクターで形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞にも関する。さらに組換えMT-MMP-3の製造法及びその用途も包含している。またMT-MMP-3に特異的に結合する抗体にも関する。別の観点からは上記の産物を用いた測定試薬、その試薬を用いた測定方法にも関する。特には、生体内及び生体外でのMT-MMP-3を測定する手法も提供される。本発明は、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であるがMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩、そのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩、それらをコードする遺伝子、例えばDNA、RNAなど、その遺伝子を遺伝子組換え技術で操作することが可能のように含有しているベクターあるいはプラスミド、こうしたベクターなどで形質転換された宿主細胞、その宿主細胞を、培養して該タンパク質またはその塩を製造する方法、こうして得られた該タンパク質またはその塩やそのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩を用いて得られた抗体、特にはモノクローナル抗体、その抗体を產生するハイブリドーマ細胞、該単離された遺伝子、例えばDNA、RNAなどをプローブとして用いたり、あるいは該抗体を用いた測定診断手段に関する。

【0013】特には本発明は、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であるがMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMP-3と実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩、そのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩、それらをコードする遺伝子、例えばDNA、RNAなど、その遺伝子を遺伝子組換え技術で操作することが可能のように含有しているベクターあるいはプラスミド、こうしたベクターなどで形質転換された宿主細胞、その宿主細胞を、培養して該タンパク質またはその塩を製造する方法、こうして得られた該タンパク質またはその塩やそのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩を用いて得られた抗体、特にはモノクローナル抗体、その抗体を產生するハイブリドーマ細胞、該単離された遺伝子、例えばDNA、RNAなどをプローブとして用いたり、あるいは該抗体を用いた測定診断手段に関する。好ましくは、本発明では、配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有することを特徴とするMT-MMP-3またはその塩が挙げられる。

【0014】本発明に従えば、次のような態様、すなわち

(1) 潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2

8

活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩、

(2) 該タンパク質がMT-MMP-3またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つものであることを特徴とする上記第(1)項記載のタンパク質、

(3) C末端領域に、配列表の配列番号：2のA1a  
561 ~Phe<sup>564</sup>で表されるアミノ酸配列又はそれと実

10 實質的に同等のアミノ酸配列を有することを特徴とする上記第(1)又は(2)項記載のタンパク質、

(4) 配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有するMT-MMP-3またはその塩であることを特徴とする上記第(1)～(3)項のいずれか一記載のタンパク質、

(5) 外因性DNA配列を原核生物において発現して得たものであるか、あるいは真核生物で発現させて得たものであることを特徴とする上記第(1)～(4)項のいずれか一記載のタンパク質、

20 (6) 配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴とする上記第(1)～(5)項のいずれか一記載のタンパク質、

(7) 上記第(1)～(6)項のいずれか一記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

【0015】(8) 上記第(1)～(7)項のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする核酸、

30 (9) 上記第(2)～(4)項のいずれか一記載のMT-MMP-3をコードする塩基配列を有するDNA遺伝子であることを特徴とする上記第(8)項記載の核酸、

(10) 配列表の配列番号：1で表される塩基配列のうちオープンリーディングフレーム部分又はそれと実質的に同等な活性を有する塩基配列を有することを特徴とする上記第(8)又は(9)項記載の核酸、

(11) 上記第(8)～(10)項のいずれか一記載の核酸を含有することを特徴とするベクター、

40 (12) 上記第(8)～(10)項のいずれか一記載の核酸又は上記第(11)項記載のベクターを保有することを特徴とする形質転換体、及び

(13) 上記第(12)項記載の形質転換体を増殖可能な栄養培地中で培養し、組換えタンパク質としてMT-MMP-3またはその塩を包含する上記第(1)～

(6) 項のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドを生成せしめることを特徴とするMT-MMP-3またはその塩を包含する上記第(1)～(6)項のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドの製造方法が提供される。

【0016】本発明は、

(14) 潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの

(6)

特開平9-87299

9

一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩に対する抗体、

(15) MT-MMP-3またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つものであるタンパク質に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)項記載の抗体、

(16) 配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するMT-MMP-3又はその塩であるタンパク質に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)又は(15)項記載の抗体、

(17) 外因性DNA配列を原核生物において発現して得たものであるか、あるいは真核生物で発現させて得たものであるタンパク質に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)～(16)項のいずれか一記載の抗体、

(18) 配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)～(17)項のいずれか一記載の抗体、

(19) タンパク質の部分ペプチド又はその塩に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)～(18)項のいずれか一記載の抗体、

(20) 抗血清であることを特徴とする上記第(14)～(19)項のいずれか一記載の抗体、

(21) モノクローナル抗体であることを特徴とする上記第(14)～(19)項のいずれか一記載の抗体、

(22) MT-MMP-3又はその塩に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする上記第(14)～(19)及び(21)項のいずれか一記載の抗体、

【0017】(23) 潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を抗原として用い、それに対する抗体を得ることを特徴とする潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体の製造方法、

(24) 潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩で免疫した動物から得られた、潜在型MMP-2の活性化能を有するM

50

Pの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体を産生する細胞を、継代培養可能な細胞と融合せしめ、継代培養可能かつMT-MMP-3を包含するタンパク質に対する抗体を産生するハイブリッド細胞を選別することを特徴とする上記第(21)又は(22)項記載の抗体の産生方法、

(25) 潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を試薬として用いるか、あるいは上記第(14)～(22)項のいずれか一記載の抗体を試薬として用いることを特徴とするMT-MMP-3の検出・測定方法、

(26) 上記第(25)項のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる標識化されたMT-MMP-3に対する抗体、

20 (27) 上記第(25)項のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩であることを特徴とする標識化されたタンパク質あるいは部分ペプチド又はその塩、

(28) MT-MMP-3発現細胞あるいは組織の検出・測定方法に用いる潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその部分ペプチドをコードすることを特徴とする標識化された核酸、及び

(29) ハイブリダイゼーション・プローブであることを特徴とする上記第(28)項記載の核酸を提供する。

【0018】本発明に従えば、特に次のような態様、すなわち

40 (30) 配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴とするMT-MMP-3またはその塩、

(31) 上記第(30)項記載のMT-MMP-3の部分ペプチドまたはその塩、

(32) 上記第(30)項記載のMT-MMP-3をコードする塩基配列を有するDNA遺伝子、

(33) 配列表の配列番号：1で表される塩基配列を有する上記第(32)項記載のDNA遺伝子、

(34) 上記第(32)項記載の遺伝子を含有するベクター、

(35) 上記第(32)項記載の遺伝子又は上記第(3

(7)

特開平9-87299

11

4) 項記載のベクターを保有する形質転換体、及び  
 (36) 上記第(35)項記載の形質転換体を増殖可能な栄養培地中で培養し、組換えタンパク質としてMT-MMP-3またはその塩を生成せしめることを特徴とするMT-MMP-3またはその塩の製造方法、

(37) 上記第(30)項記載のMT-MMP-3又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を抗原として用い、それに対する抗体を得ることを特徴とするMT-MMP-3に対する抗体の製造方法が提供される。

【0019】特に本発明は、

(38) 上記第(31)項記載のMT-MMP-3に対する抗体、

(39) 抗血清であることを特徴とする上記第(38)項記載のMT-MMP-3に対する抗体、

(40) モノクローナル抗体であることを特徴とする上記第(38)項記載のMT-MMP-3に対する抗体、

(41) 上記第(30)項記載のMT-MMP-3又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩で免疫した動物から得られたMT-MMP-3に対する抗体を産生する細胞を、継代培養可能な細胞と融合せしめ、継代培養可能かつMT-MMP-3に対する抗体を産生するハイブリッド細胞を選別することを特徴とする上記第

(40) 項記載のMT-MMP-3に対するモノクローナル抗体の產生方法、

(42) 上記第(30)項記載のMT-MMP-3又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を試薬として用いるか、あるいは上記第(38)項記載のMT-MMP-3に対する抗体を試薬として用いることを特徴とするMT-MMP-3の検出・測定方法、

(43) 上記第(42)項記載のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる標識化されたMT-MMP-3又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩、及び

(44) 上記第(42)項記載のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる標識化されたMT-MMP-3に対する抗体を提供する。

【0020】

【発明の実施の形態】潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であるがMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMP(例えば、MT-MMP-3)と実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩、そのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩、それをコードする遺伝子、例えばDNA、RNAなど、その遺伝子を遺伝子組換え技術で操作することが可能ないように含有しているベクターあるいはプラスミド、こうしたベクターなどで形質転換された宿主細胞、その宿主細胞を、培養して該タンパク質またはその塩を製造する方法、こうして得られた該タンパク質またはその塩やそのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩を用いて得られた抗体、特にはモノクローナル抗体、その抗体を產生するハイブリ

50

12

ドーマ細胞、該単離された遺伝子、例えばDNA、RNAなどをプローブとして用いたり、あるいは該抗体を用いた測定診断手段が提供される。

【0021】より具体的には、本発明は配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有することを特徴とするMT-MMP-3またはその塩を提供する。本発明のMT-MMP-3としては、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外であって潜在型MMP-2活性化能を有することを特徴とし潜在型MMP-2活性化因子でかつ新規なアミノ酸配列を有するものであればよい。より好ましくは本発明のMT-MMP-3としては、配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するものがすべて挙げられる。さらに本発明のMT-MMP-3としては、プレ部分として配列中のアミノ酸番号1位のMetから21位のPheまでのアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよく、プロ部分としてアミノ酸番号22位のPheから119位のArgまでのアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよい。

こうした配列を有するものはすべて包含されてよい。本発明のMT-MMP-3は、配列表の配列番号：1で表される塩基配列の113から115位のATGから1922から1924位のGTCより構成される塩基配列にコードされるもの(1925から1927位の終止コドンTGAは、TAAまたはTAGでも有りうる)であることができるし、また、該塩基配列と相同性を有するが、MT-MMP-1以外の配列を持ち且つ潜在型MMP-2の活性化能を有するといったそれと同効の塩基配列を含有するDNA配列でコードされるものであることができる。該MT-MMP-3の塩基配列は、修飾(例えば、付加、除去、置換など)されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。

【0022】配列表の配列番号：1で表される塩基配列またはそれと同効の塩基配列を含有する本発明のDNAは、例えば以下に示す方法によって取得した。なお、遺伝子組換え技術は、例えばT. Maniatis et al., "Molecular Cloning", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); 日本化学会編、「統生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、東京化学同人(1986); 日本化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III(組換えDNA技術)」、東京化学同人(1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68, Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 & 101, Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153, 154 & 155, Academic Press, New York (1987)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。

(8)

特開平9-87299

13

【0023】種々のヒト組織（胎盤、口腔癌、肺癌等）あるいは培養細胞（ヒト線維肉腫細胞H T 1 0 8 0、ヒト単球性白血病細胞U 9 3 7等）からm R N Aを単離する。特に好適にヒト口腔癌細胞よりm R N Aを単離できる。m R N Aの単離は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、T. Maniatis et al., "Molecular Cloning", 2nd Ed., Chapter 7, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); L. Grossman et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 12, Part A & B, Academic Press, New York (1968); S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p.33 & p.215, Academic Press, New York (1987); Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979 などに記載の方法、例えばグアニジン塩化セシウム法、チオシアノ酸グアニジン法、フェノール法などの方法で行うことができる。必要に応じ、得られた全R N Aはオリゴ(d T)一セルロースカラムなどを使用して精製してポリ(A)' m R N Aを得ることが出来る。このm R N A及び逆転写酵素を用いてc D N Aを作製する。m R N A及び逆転写酵素を用いてのc D N A合成は当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、H. Land et al., "Nucleic Acids Res.", Vol. 9, 2251 (1981); U. Gubler et al., "Gene", Vol. 2 5, 263-269 (1983); S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p.307, Academic Press, New York (1987) などに記載の方法が挙げられる。

【0024】こうして作製されたc D N Aを基にc D N Aライブラリーを構築できる。またファージベクターを使用する以外で、大腸菌などの宿主細胞の形質転換をするには、例えばカルシウム法、ルビジウム/カルシウム法など当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができる(D. Hanahan, J. Mol. Biol., Vol. 166, p.557 (1983)など)。さらに市販の種々ヒト組織由来c D N Aライブラリー（例えば、C L O N T E C Hなどより入手可能）を直接使用することもできる。作製されたc D N Aを鋳型にP C R增幅反応を行う。典型的な場合、既知のM M Pファミリーのアミノ酸配列から選択した、高度に保存されているアミノ酸配列を基に、デジネレイテッド・プライマーを作製する。プライマーの作製は、当該分野で知られた方法で行うことができ、例えばD N A自動合成装置を用い、フォスフォジエステル法、フォスフォトリエステル法、フォスフォアミダイト法などにより合成できる。このプライマーと上記作製したc D N Aとを用い、P C Rを行う。P C R反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えばR. Saiki, et al., Science, Vol. 230, pp. 135 0 (1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487 (1985); P C Rテクノロジー(PCR Technology),

50

一訂 9-

14

ストックトンプレス(Stockton Press)などに記載された方法に従って行うことができる。

【0025】得られたP C R産物をクローニングし、得られたP C R産物の塩基配列を決定し、新規なM M P遺伝子配列を有するD N A断片を取得する。塩基配列の決定は、ダイデオキシ法、例えばM 1 3ダイデオキシ法など、Maxam-Gilbert法などを用いて行うことができるが、市販のシークエンシングキット、例えばTaqダイブライマーサイクルシークエンシングキットなどを用いたり、自動塩基配列決定装置、例えば蛍光D N Aシーケンサー装置などを用いて行うことができる。特にはこのD N A断片をプローブに種々のヒト組織（胎盤、口腔癌、肺癌等）あるいは培養細胞（ヒト線維肉腫細胞H T 1 0 8 0、ヒト単球性白血病細胞U 9 3 7等）から構築されたc D N Aライブラリーをスクリーニングし、塩基配列の決定から目的とするD N Aを単離することができる。好ましくは胎盤c D N Aライブラリーをスクリーニングし、塩基配列の決定をして目的とするD N Aを単離する。なお、プローブなどを放射性同位体などによって標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライムD N Aラベリングキット(Boehringer Mannheim)などを使用して行うことができる。

【0026】以下にさらに詳細に記述する。本発明者らは、既知のM M Pファミリーの触媒ドメイン中から選択した高度に保存されているアミノ酸配列G E A D I L V及びG D A H F D D D Eを基に、次の配列を有する5'プライマー、

5 P-4 配列番号：3

S G N V V N G C W G A Y A T M R T S A T

30 (配列中、S=C又はG、N=A又はC又はG又はT、V=A又はC又はG、W=A又はT、Y=C又はT、M=A又はC、R=A又はCのそれぞれのミックスド・ベースを示す) 及び次の配列を有する3'プライマー、

3 P-2 配列番号：4

Y T C R T S N T C R T C R A A R T G R R H R T C Y  
C C

(配列中、Y=C又はT、R=A又はG、S=C又はG、N=A又はC又はG又はT、H=A又はC又はTのそれぞれのミックスドベースを示す) を設計、合成した。なお、上記の配列のうち、S、N、V、W、Y、M、R及びHはそこに複数の塩基を導入すること、そしてその結果マルチブルなヌクレオチド配列を生ずることを示している。プライマーはM M Pファミリーに特徴的な領域のアミノ酸配列に基づいてデザインし、合成し、使用することができる。

【0027】これらのプライマーとヒト口腔癌細胞から調製したc D N Aライブラリーを用い、P C R反応を行った。プライマーのデザインから予想されるサイズ(9 0から120 b. p.)を持つところの得られたP C R産物をサブクローニングし、塩基配列を決定した結果、

(9)

特開平9-87299

15

MMP-1、MMP-9と同一な配列を持つPCR産物以外に、既知のMMPと相同性を有するが、配列が新規な93b.p.のDNA断片を得た。同様にこれらプライマーと各種のヒト細胞由来のcDNAライブラリーを用いて、MMP-1、MMP-9と同一な配列を持つPCR産物以外に、既知のMMPと相同性を有するが、配列が新規なPCR産物を検索することもできる。この93b.p.DNA断片をプローブとして、ヒト胎盤cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、2.1kbのDNA断片が得られた。この断片の塩基配列の決定から配列表の配列番号：1で表される塩基配列が得られた。配列表の配列番号：1で表される塩基配列と同一の配列は、GENEBANK/EMBL DNA Database中には存在せず、この塩基配列を有するDNAは全く新規なものであることが認められた。

【0028】配列表の配列番号：1で表される塩基配列を有する上記のクローンの塩基配列は、3'非翻訳配列と共に推定604個のアミノ酸残基をコードするオープンリーディングフレームを有していた。開始コドンのすぐ下流から推定されるシグナル配列が続き、C末端のアミノ酸番号561から584に24個の疎水性アミノ酸の連続した膜結合型タンパク質に特徴的な疎水性領域の存在が認められた。こうして得られた新規MMPを「MT-MMP-3」と命名した（本発明者等は当初MT-MMP-2と呼称した（平成7年7月14日日本国出願の特願平7-200319号並びに特願平7-200320号）が、ゴードン・リサーチ・コンファレンス・オン・マトリックス・メタロプロテアーゼズ（アンドーバー・エヌエイチ 1995年7月16-21日）[Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases (Andover, NH July 16-21, 1995)]の会合での合意に基づいて新たにMT-MMP-3と呼ぶことになった）。

【0029】MT-MMP-3遺伝子産物の確認を、MT-MMP-3遺伝子をトランسفェクションした COS-1細胞などの適した動物細胞などを用いて行った。この外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法（例えば、F. L. Graham et al., "Virology", Vol. 52, pp. 456 (1973)など）、DEAE-デキストラン法（例えば、D. Warden et al., "J. Gen. Virol.", Vol. 3, pp. 371 (1968)など）、エレクトロポレーション法（例えば、E. Neumann et al., "EMBO J.", Vol. 1, pp. 841 (1982)など）、マイクロインジェクション法、リボソーム法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうしてMT-MMP-3遺伝子をトランسفェクションされた動物細胞の產生する遺伝子産物を抗MT-MMP-3モノクローナル抗体を用いた免疫沈降実験で解析した結果、細胞溶解物から64kDaのタ

50

-訂 10-

16

ンパク質が免疫沈降されたのに対し、培養上清からは相当するタンパク質は検出されなかった。すなわち、MT-MMP-3遺伝子産物は分泌されることなく、細胞表層上で発現していることが示唆された。図1～図5に示すように既知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同性を調査した結果、MT-MMP-3は既知のMMPファミリーと高い相同性を示した。MMPファミリーで保存されている前駆体と成熟体のプロセッシング部位近傍の配列、および活性部位の配列はMT-MMP-3中で最も良好に保存されていた。また、MMPの1次構造上の特徴であるプロペチドドメイン、Zn<sup>2+</sup>結合触媒ドメイン、プロリンに富んだヒンジドメイン、C-末端のヘモペキシン凝血酵素様ドメインは良好に保存されていた。

【0030】さらにMT-MMP-3では、MT-MMP-1（先に本発明者らが単離同定したMT-MMPはその區別をなすため「MT-MMP-1」と命名し直した）と同じくC末端領域に疎水性アミノ酸の連続した配列が存在することから、膜結合型のMMPであることが示唆された。このような疎水性アミノ酸の連続した配列は、他のMMPファミリーには存在しない。実際、遺伝子工学的にこの疎水性アミノ酸の連続配列を分泌タンパク質と融合させた融合タンパク質を作成し培養細胞で発現させたところ、融合タンパク質の分泌は抑えられ細胞膜上で発現したことから、この疎水性アミノ酸の連続配列がトランスメンブレン・ドメインとして機能していることが示された。したがって、MT-MMP-3遺伝子は、新規なMMPタンパク質をコードしていることは明白であり、MT-MMP-3遺伝子を用いて作製した組換え体プラスミドは全て新規な組換え体であり、そのプラスミドで形質転換あるいはトランسفェクトされ得られた形質転換体あるいはトランسفェクタントも新規なものである。

【0031】MT-MMP-3遺伝子を組込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、CHO細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主）中で該DNAが発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適なコドンが導入されていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結合するに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生素耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列等を含んでいることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファン(trp)プロモーター、ラクトース(lac)プロモーター、トリプトファン・ラクトース(lac)プロモーター、リポプロテイ

(10)

特開平9-87299

17

ン (1 p p) プロモーター、 $\lambda$  ファージ P L プロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40 レートプロモーター、MMTV LTR プロモーター、RSV LTR プロモーター、CMV プロモーター、SR $\alpha$  プロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10 プロモーター等を使用し得る。

【0032】大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えば pBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf (-)、pBluecript KS<sup>TM</sup> (Stratagene) などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、pAS、pKK223 (Pharmacia)、pMC1403、pMC931、pKC30なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドとしては、SV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、例えば pCD、pCD-SR $\alpha$ 、CDM8、pCEV4、pME18S、pBC12BI、pSG5 (Stratagene) などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、YIp型ベクター、YEp型ベクター、YRp型ベクター、YCp型ベクターなどが挙げられ、例えば pGPD-2などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌K12株に由来するものが挙げられ、例えば NM533 XL1-Blue、C600、DH1、HB101、JM109などが挙げられる。宿主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS7細胞、COS-1細胞、CV-1細胞、マウス線維芽細胞由来のCOP細胞、MOP細胞、WOP細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来のCHO細胞、CHO DHFR 細胞、ヒトHeLa細胞、マウス細胞由来C127細胞、マウス細胞由来NIH3T3細胞などが挙げられる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*) をベクターとし、カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えば Bm-N 細胞などを用いることが挙げられる。

【0033】本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA断片をクローニングするのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA修飾・分解酵素、DNAポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNAリガーゼなどを用いることが出来る。制限酵素としては、例えば、R. J. Roberts, Nucleic Acids Res, Vol. 13, r165 (1985); S. Linn et al. ed. Nucleases, p. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982 などに

-訂 11-

(10) 18

記載のものが挙げられる。逆転写酵素としては、例えばマウスマロネイ白血病ウイルス (mouse Moloney leukemia virus; MMLV) 由来の逆転写酵素 (reverse transcriptase)、ニワトリ骨髄芽球症ウイルス (avian myeloblastosis virus; AMV) 由来の逆転写酵素などが挙げられ、特にはRNase H 欠損体などは好ましく用いることが出来る。DNAポリメラーゼとしては、例えば大腸菌DNAポリメラーゼ、その誘導体であるクレノウ・フラグメント、大腸菌ファージT4 DNAポリメラーゼ、大腸菌ファージT7 DNAポリメラーゼ、耐熱菌DNAポリメラーゼなどが挙げられる。末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼとしては、例えば R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 96, Academic Press, New York (1983) に記載の3'-OH末端にデオキシヌクレオチド (dNMP) を付加する TdTase などが挙げられる。DNA修飾・分解酵素としては、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼなどが挙げられ、例えばヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエ斯特ラーゼ、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼI、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼIII、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼVII、 $\lambda$ エキソヌクレアーゼ、DNase I、ヌクレアーゼS1、ミクロコッカス (Micrococcus) ヌクレアーゼなどが挙げられる。DNAリガーゼとしては、例えば大腸菌DNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼなどが挙げられる。DNA遺伝子をクローニングしてDNAライブラリーを構築するのに適したベクターとしては、プラスミド、 $\lambda$  ファージ、コスミド、P1 ファージ、F因子、YAC などが挙げられ、好ましくは $\lambda$  ファージ由来のベクターが挙げられ、例えば Charon 4A、Charon 21A、 $\lambda$  gt10、 $\lambda$  gt11、 $\lambda$  DASHII、 $\lambda$  FIXII、 $\lambda$  EMBL3、 $\lambda$  ZAPII<sup>TM</sup> (Stratagene) などが挙げられる。

【0034】さらに、本発明に係わるMT-MMP-3 の遺伝子塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、MT-MMP-3 のアミノ酸配列中に適宜、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したごとき変異を導入した相当するタンパク質を製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、日本生化学会編、「統生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、p105 (広瀬進)、東京化学同人 (1986) ; 日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III (組換えDNA技術)」、p233 (広瀬進)、東京化学同人 (1992) ; R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York (1987) ; R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983) ; J. A. Wells et al., "Gene", Vol. 34, p. 315 (1985) ; T. Grundstrom et al., "Nucleic Acids Res", Vol. 13, p. 3305 (1985)

(11)

特開平9-87299

19

J. Taylor et al., "Nucleic Acids Res.", Vol. 13, p.8765 (1985); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987); A. R. Oliphant et al., "Gene", Vol. 44, p.177 (1986) などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法(部位特異的変異導入法)、Kunkel法、dNTP[ $\alpha$ S]法(Eckstein)法、亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。さらに得られた本発明のタンパク質は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などにすることができる。また遺伝子組換え法で製造する時に融合タンパク質として発現させ、生体内あるいは生体外で天然のMT-MMP-3と実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合タンパク質はその融合部を利用してアフィニティクロマトグラフィーなどで精製することも可能である。タンパク質の構造の修飾・改変などは、例えば日本生化学会編、「新生化学実験講座1、タンパク質VII、タンパク質工学」、東京化学同人(1993)を参考にし、そこに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法、さらにはそれらと実質的に同様な方法で行うことができる。また下記するようにその生物学的活性のうちには、免疫的に活性、例えば抗原性を有するということも含まれてよい。

【0035】かくして本発明は、1個以上のアミノ酸残基が同一性の点で天然のものと異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものと異なるものであってもよい。本発明は、MT-MMP-3に特有なアミノ酸残基が1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)欠けている欠失類縁体、特有のアミノ酸残基の1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体も包含する。MMPの共通の特徴であるドメイン構造やC末端のトランスメンブレンドメイン構造が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含される。また本発明のMT-MMP-3は天然のMT-MMP-3と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然のMT-MMP-3

と実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。こうした本発明のMT-MMP-3は、下記で説明するように分離・精製処理されることができる。こうして得られた本発明の潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMP(特には、MT-MMP-3)と実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩、あるいはその部分ペプチドは、それを用いて酵素阻害剤の開発や探索などの研究、医薬品の開発研究、MT-MMP-3が関与すると考えられる生物的な現象や反応の研究を行うことができるし、さらにはそれに対する抗体を作成するのに用いることができるし、特定の分析あるいは測定対象物を調査研究するのに使用することができる。一方では、こうして本発明は上記したポリペプチドをコードするDNA配列、そして天然の特性の全部あるいは一部を有するMT-MMP-3のポリペプチド、さらにその類縁体あるいは誘導体をコードするDNA配列も包含する。

【0036】本発明のDNA配列は、これまで知られていないかった哺乳動物のタンパク質のアミノ酸配列に関する情報を提供しているから、こうした情報を利用することも本発明に包含される。こうした利用としては、例えばMT-MMP-3及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはヒトの、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブの設計などが挙げられる。本発明のDNA配列は、例えばMT-MMP-3及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはヒトの、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブとして有用である。遺伝子の単離にあたっては、PCR法、さらには逆転写酵素(RT)を用いたPCR法(RT-PCR)を利用することが出来る。MT-MMP-3 cDNA及びその関連DNAは、クローニングされ、配列決定されたMT-MMP-3 cDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、DNAプライマーをデザインして化学合成し、得られたDNAプライマーを用いて、PCR法、RT-PCR、その他の方法を用いてMT-MMP-3関連遺伝子の単離、検出などに利用することが出来る。MT-MMP-3がMT-MMP-1の構造的特徴を良好に保存していたことから、MT-MMP-3も潜在型MMP-2の活性化因子として作用する可能性が想定される。そこで、COS-1細胞などの哺乳動物細胞に潜在型MMP-2の発現プラスミド及びMT-MMP-3の発現プラスミドをコトランスフェクションし、回収された培養上清を用いてザイモグラフィーを行った。その結果、本来、分子量68kDaに検出される潜在型MMP-2以外に、62kDaの活性型MMP-2及び64kDaの活性中間体が検出され、MT-MM

(12)

特開平9-87299

21

P-3の発現に依存した潜在型MMP-2の活性化が観察された。

【0037】MT-MMP-3 mRNAのヒト組織中の発現を各種の組織由来Poly(A)<sup>+</sup>RNAに対するノーザンプロット分析により検討した。その結果、ヒト肺、脳、胎盤で高い発現が認められたが、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、筋肉組織では検出されなかった。本発明者らの研究では、MT-MMP-1 mRNAの発現は肺、腎臓、胎盤で顕著に高いのに対し、脳では最も低かった。これらのことは、MT-MMP-3は、MT-MMP-1とは構造的にも潜在型MMP-2の活性化能という機能的にも非常に類似しているが、実際の組織中の遺伝子発現は異なる制御を受けていることを示している。本発明のcDNAをプローブとして用いれば、例えばノーザン・プロティング、サザン・プロティング、in situハイブリダイゼーションなどによりヒト組織中のMT-MMP-3 mRNAの発現やMT-MMP-3遺伝子自体などを検出・測定でき、ひいては癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療、またアルツハイマー病の診断等の研究に応用できる。以上述べた、本発明者らの研究成果によりMT-MMP-3の遺伝子及び組換えDNA分子を宿主に移入し、MT-MMP-3を発現させ、目的とするMT-MMPを得る方法が提供される。こうして本発明によれば、MT-MMP-3の遺伝子を実質的に発現する組換え体あるいはトランスフェクタント及びその製造法、さらにはその用途も提供される。別の面では、本発明は潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩、より好ましくはMT-MMP-3またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つ該タンパク質の少なくとも一部あるいは全部を有するポリペプチドを、大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物で発現させることを可能にするDNAやRNAなどの核酸に関することができる。またこうした核酸、特にDNAは、(a)配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列をコードできる配列あるいはそれと相補的な配列、(b)該(a)のDNA配列またはその断片とハイブリダイズすることのできる配列、及び(c)該(a)又は(b)の配列にハイブリダイズすることのできる縮重コードを持った配列であることができる。こうした核酸で形質転換され、本発明の該ポリペプチドを発現できる大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物も本発明の特徴をなす。

【0038】さらに、本発明では、本発明に係わるMT-MMP-3と特異的に結合するモノクローナル抗体などの抗体が提供される。本発明に係わるモノクローナル

抗体などの抗体により、癌の診断はもとより癌の浸潤、転移に係わる研究に有用な研究手段、さらにはアルツハイマー病の発症機序や診断方法に係わる研究に有用な研究手段が提供される。本発明に係わるモノクローナル抗体などの抗体は、本発明により得られるヒトMT-MMP-3を免疫原として公知の方法で動物を免疫したり、当該分野で知られたあるいは汎用されている方法、例えばミルシュタインらの方法(Nature, 256:495~497, 1975)により製造することができる。この方法において、免疫原としては天然型MT-MMP-3、リコンビナントヒトMT-MMP-3及び連続した少なくとも8個のアミノ酸からなるMT-MMP-3の一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド等の何れでも使用することができる。さらに該モノクローナル抗体は、常用される方法によって適宜標識することができる。標識としては、酵素、補欠分子類、色素物質、蛍光物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、放射性物質等を使用することができる。以下抗体の作製につき詳しく述べる。

【0039】本発明のモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞を用いての細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってよいことはいうまでもない。本発明のモノクローナル抗体は、例えば次のような工程で作製できる。

1. 免疫原性抗原の調製
2. 免疫原性抗原による動物の免疫
3. ミエローマ細胞(骨髄腫細胞)の調製
4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合
5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローナ化
6. モノクローナル抗体の製造

#### 【0040】1. 免疫原性抗原の調製

抗原としては、例えば天然由来のMT-MMP-3、本発明の方法に従い調製したリコンビナントMT-MMP-3を用いることができる。MT-MMP-3は、さらに免疫原性コンジュゲートなどにしてもよいが、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するに使用できる。こうした抗原は、各種原料、例えば培養細胞、培養組織など、形質転換細胞などの抗原産生材料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミド電気泳動、モノクローナル抗体などの抗原を特異的に認識

(13)

特開平9-87299

23

する抗体などを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。例えば、ゼラチンーアガロース・アフィニティー・クロマトグラフィー、ヘパリンーアガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。さらに M T - M M P - 3 は、それを断片化したもの、あるいはクローニングされ、配列決定された c D N A 配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成し、得られた合成ポリペプチド断片であってもよく、その断片を適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテンータンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみを認識できるモノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることができる。こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。活性化結合基としては、(1) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2) 活性化ジチオ基、例えば2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(K L H)、牛血清アルブミン(B S A)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプタイド、細菌菌体成分、例えば B C G などが挙げられる。

【0041】2. 免疫原性抗原による動物の免疫  
動物を免疫するには、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、統生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。抗原と共に用いられるアジュvantとしては、例えばフロント完全アジュvant、リビ(R i b i)アジュvant、百日咳ワクチン、B C G、リビッドA、リポソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えばB A L B / c などのマウスをはじめとする動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1~400 μ g / 動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1~4週間おきに、好ましくは1~2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2~10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしてはB A L B / c 系マウスの他、B A L B / c 系マウスと他系マウスとのF 1 マウスなどを用いることができる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫

の程度を確認できる。一方では、本発明に従えばリコンビナントM T - M M P - 3 を用い、M T - M M P - 3 に対するポリクローナル抗体及びその製造にも関する。こうした場合、使用される動物としては、哺乳動物や鳥類などが利用できるが、例えばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、サル、イヌ、ネコ、ニワトリなどが挙げられる。抗体は抗血清であってもよく、より精製されたものであってもよく、例えばその単離精製は下記モノクローナル抗体と同様にして行うことができる。

【0042】3. ミエローマ細胞(骨髄腫細胞)の調製  
細胞融合に使用される無限増殖可能株(腫瘍細胞株)としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えばP 3 - N S - 1 - A g 4 - 1 (N S - 1, Eur. J. Immunology, 6, 511~519, 1976)、S P 2 / 0 - A g 1 4 (S P 2, Nature, 276, 269~270, 1978)、マウスミエローマM O P C - 2 1 セルライン由来のP 3 - X 6 3 - A g 8 - U 1 (P 3 U 1, Current topics in Microbiol. and Immunol., 81, 1~7, 1978)、P 3 - X 6 3 - A g 8 (X 6 3, Nature, 256, 495~497, 1975)、P 3 - X 6 3 - A g 8 - 6 5 3 (6 5 3, J. Immunol., 123, 1548~1550, 1979)などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコM E M 培地(D M E M 培地)、R P M I - 1 6 4 0 培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清(F C S)などを加え、さらに8-アザグアニン(例えば5~45 μ g / m l)を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2~5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37°Cで完全に解凍したのちR P M I - 1 6 4 0 培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってよい。

【0043】4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合  
上記2. の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2~5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記3. の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地(M E M 培地)、D M E M 培地、R P M I - 1 6 4 0 培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス(H V J : Hemagglutinating virus of Japan)なども挙げられる。好ましくは、例えば30~60%のポリエチレングリコールを

(14)

特開平9-87299

25

0.5～2ml加えることができ、分子量が1,000～8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000～4,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30～60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞（リンパ球）：ミエローマ細胞株の割合は、例えば1:1～2:0:1とすることが挙げられるが、より好ましくは4:1～7:1とすることができます。融合反応を1～10分間行い、次にRPMI-1640培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うことができる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

【0044】5. ハイブリドーマ（融合細胞）の選択及びモノクローナル化

選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含む、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの培地、所謂HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と等容量を翌日加え、その後1～3日ごとにHAT培地で半量ずつ交換するというようになることができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8～16日目には、アミノブテリンを除いた、所謂HAT培地で1～4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析（RIA）、酵素免疫分析（ELISA）、蛍光免疫分析（FIA）などの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置（FACS）などで、MT-MMP-3あるいはその断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたりする。目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされる。限界希釈法により好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

【0045】6. モノクローナル抗体の製造

得られたハイブリドーマ株は、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るために、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に產生されたモノクローナル抗体を

回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン（2,6,10,14-テトラメチルペントデカン）などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティーカラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片（例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など）を固定化したアフィニティー・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0046】またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドーマ株から得られた抗体をコードする核酸配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。さらにこれら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(a'b')<sub>2</sub>といった抗体フラグメントにして使用してもよい。標識物を付与する抗体としては、IgG画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいはβ-D-ガラクトシダーゼなど）、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。本発明での検知・測定は、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイを行なうことができる、ラジオイムノアッセイ、ELISAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもあるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは放射免疫測定法や酵素免疫測定法であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、MT-MMP-3に対する抗体の一方を検出可能に標識化する。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるためインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわちMT-MMP-3の量と比例する。このアッセイでは、不溶化抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード(forward)サンドイッチ型アッセイある

(15)

特開平9-87299

27

いは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことができる。

【0047】抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカアルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリジルメタクリレート、アクリロレン-エチレン-グリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれを乳化重合して得られたもの、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは偏平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質(物体)の表面などが挙げられる。

【0048】これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られるMT-MMP-3に対し特異的に結合するモノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことが出来る。標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気

50

28

物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げることができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコンド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げることができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例

- 10 えば酵素的サイクリングを利用することができる。
- 【0049】代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^{3}\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などが挙げられる。代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレエート・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエスチラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリ・フォスファターゼなどが挙げられる。アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用して酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビシン(ストレプトアビシン)に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なる種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うこと可能にすることもできる。
- 20 【0050】本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、1,2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬の組合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リポ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるもののが使用できる。蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチ

(16)

特開平9-87299

29

オシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしいうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。

【0051】縮合剤としては、例えばグルタルアルdehyド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N, N' - ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N, N' - エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビスクシニミジルスクシネット、ビスジアゾベンジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネット(S PDP)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(S MCC)、N-スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

【0052】本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるとし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。本発明の定量法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト

50

製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。測定にあたっては至適pH、例えばpH約4~9に保つように適当な緩衝液系中で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、トリス-塩酸緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗体抗原反応は約0℃~60℃の間の温度で行うことが好ましい。

【0053】酵素などで標識されたモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗体抗原反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。抗体抗原反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗体抗原反応自体を安定化するよう適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、界面活性化剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液中に加えることもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)がより好ましい。当該分野で普通に採用されていたあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることができる。本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうるが、好ましくは生物由来の試料、例えば血液、血清、血漿、関節液、脳脊髄液、唾液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジネート、生検試料、組織、細胞などが挙げられる。なお、本発明のDNAも上記抗体と同様に処理することが出来、それ自体公知の方法又はそれと実質的に同様な方法で標識されたり、測定に用いることができるることは理解されるべきである。

【0054】本発明の前述した種々の態様を利用するこ

(17)

31

により、癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療に関わる研究に有用な診断手段として、あるいはその他の医学的生理学的用途に適用される種々の技術手段を提供することができる。以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されず、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。なお、明細書及び図面において、塩基及びアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものであり、アミノ酸に光学異性体が存在する場合は、特に断らないかぎりL-体を示す。後述の実施例1(e)で得られた大腸菌NM533 XL1-Blue (XL1-Blue/MMP-X2)は、平成7年7月5日(原寄託日)から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託されており(微研菌寄第P-15033号)、平成8年7月1日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、受託番号FERM BP-5573としてNIBHに保管されている。後述の実施例3(f)～(h)で得られたマウス由来单クローニング抗ヒト膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ-3(MT-MMP-3)抗体産生ハイブリドーマ(117-4E1)は、平成7年7月5日(原寄託日)から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託されており(微研菌寄第P-15031号)、平成8年7月1日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、寄託番号FERM BP-5572としてNIBHに保管されている。

#### 【0055】

【実施例】以下に実施例を挙げ、本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されることなく様々な態様が含まれることは理解されるべきである。

#### 実施例1 新規なメタロプロテアーゼ(MT-MMP-3)cDNAの単離

新規なMMP cDNAの単離は基本的に以下の方法にしたがって行った。1) MMPファミリーで保存されている配列からデジネレイティッドプライマーを合成し、ヒト組織由来cDNAのスクリーニングを行い、PCR産物を得る。

2) 得られた部分的クローナーをプローブとして、cDNAライプラリーよりcDNA全長をスクリーニングする。

##### (a) cDNAライプラリーの構築

cDNAライプラリー作製に用いるRNAソースとしては、種々ヒト組織(胎盤、口腔癌、肺癌等)あるいは培養細胞(ヒト線維肉腫細胞HT1080、ヒト単球性白血病細胞U937等)から抽出した全RNAを使用することができる。本実施例では、口腔癌組織由来RNAを出発材料として行った結果を示した。組織からの全RN

特開平9-87299

32

Aの抽出は、グアニジン-塩化セシウム法(Biochemistry, 18: 5294~5299, 1979)にしたがって行い、得られた全RNAよりポリ(A)<sup>+</sup>mRNAをオリゴ(dT)-セルロースカラムを使用して精製した。

- 【0056】cDNAの合成はガブラー&ホフマンの方法(Gene, 25: 263~269, 1983)にしたがって行った。精製したポリ(A)<sup>+</sup>mRNAをテンプレート、ランダムヘキサマーあるいはオリゴdTをプライマーとし、SuperScript逆転写酵素(Scriptagene)を用いて1st strand cDNAを合成した。これをRNase Hで処理し、続いて大腸菌DNAポリメラーゼIを用いて、2nd strand cDNAを合成し2本鎖cDNAを作製した。cDNAの第1鎖の合成は、5μlのポリA<sup>+</sup>mRNA画分サンプル、2μlのランダム・ヘキサマー(80μM)及び反応用緩衝液4.5μlの混合物を70℃で10分間インキュベーション処理した後、氷で冷却し、これに5×反応用緩衝液4μl、0.1Mのジオキシートール(DDT)2μl、10mM dNTPs 1μl及びRNaseインヒビター1μlを加え、良く混合し、0.5μl(約100ユニット)のSuperScript reverse transcriptase(GIBCO BRL)を加え、37℃で1時間インキュベーション処理した後、70℃で10分間処理した。cDNAの第2鎖の合成は、同様にして処理して実行できる。cDNAライプラリーの構築は、例えばλgt11を使用して行うことができる。合成した2本鎖cDNAをT<sub>4</sub>DNAポリメラーゼで平滑化した後、EcoRIメチラーゼによりcDNA中に存在するEcoRIサイトをメチル化する。さらにEcoRIリンクード(pGGAATTCC)をT<sub>4</sub>DNAリガーゼで連結し、EcoRI消化することにより両末端にEcoRIサイトを有するcDNAを構築した。このcDNAをλgt11のEcoRIサイトへクローニングした。次にこのcDNAをインビトロパッケージングキットによりパッケージングし、cDNAライプラリーを構築する。cDNAライプラリーとしては市販の種々ヒト組織由来cDNAライプラリー(CLONTECH)を直接使用することもできる。
- 【0057】(b) 新規なMMP cDNA断片の増幅  
得られたcDNAをテンプレートとし、MMPファミリーで保存されているアミノ酸配列を基に合成したデジネレイティッドプライマー及びTaq DNAポリメラーゼを用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクション法(PCR)を行った。新規なMMP cDNA断片のPCR増幅は、例えばR. Saiki, et al., Science, Vol. 230, pp. 1350 (1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487 (1985); PCRテクノロジー(PCR Technology), ストックトンプレス(Stockton Press)などに記載された方法に従って行われた。1μlの上記工

(18)

特開平9-87299

33

程の反応生成物を鋳型として用い、 $5\ \mu l$  の  $10\times PCR$  緩衝液、 $1\ \mu l$  の  $2.5\text{mM}$  dNTPs、 $1\ \mu l$  の増幅用プライマー及び 1 ユニットの Taq polymerase の混合物を無菌蒸留水で  $50\ \mu l$  とした。この反応用混合物を  $93^\circ C$  で 1 分間、 $55^\circ C$  で 1 分間そして  $72^\circ C$  で 1 分間に 1 サイクルとして、30 サイクルの PCR 増幅にかけた。

**【0058】** デジネレイテッドプライマーは、以下のように設計、合成した。既知の MMP ファミリーの触媒ドメイン中から高度に保存されているアミノ酸配列として、GEADIMI (MMP-1 の Gly<sup>155</sup> ~ Ile<sup>161</sup>)、MMP-2 の Gly<sup>155</sup> ~ Ile<sup>171</sup>、MMP-3 の Gly<sup>155</sup> ~ Ile<sup>161</sup>、MMP-7 の Gly<sup>150</sup> ~ Ile<sup>156</sup>、MMP-8 の Gly<sup>154</sup> ~ Ile<sup>160</sup>、MMP-9 の Arg<sup>152</sup> ~ Ile<sup>163</sup>、MMP-10 の Gly<sup>154</sup> ~ Ile<sup>160</sup>、MMP-11 の Gly<sup>151</sup> ~ Ile<sup>157</sup> 及び MMP-12 の Gly<sup>155</sup> ~ Val<sup>161</sup> にそれぞれ相当する。アミノ酸番号は図 1 ~ 図 5 記載の番号にしたがった) 及び GDAHFDDDE (MMP-1 の Gly<sup>192</sup> ~ Glu<sup>201</sup>、MMP-2 の Gly<sup>193</sup> ~ Glu<sup>211</sup>、MMP-3 の Asn<sup>192</sup> ~ Glu<sup>201</sup>、MMP-7 の Gly<sup>187</sup> ~ Glu<sup>196</sup>、MMP-8 の Gly<sup>191</sup> ~ Glu<sup>200</sup>、MMP-9 の Glu<sup>199</sup> ~ Glu<sup>208</sup>、MMP-10 の Tyr<sup>191</sup> ~ Glu<sup>200</sup>、MMP-11 の Glu<sup>192</sup> ~ Glu<sup>201</sup>、MMP-12 の Gly<sup>192</sup> ~ Glu<sup>201</sup> にそれぞれ相当する。アミノ酸番号は図 1 ~ 図 5 に記載の番号にしたがった) を選択した (プライマー部分に相当するアミノ酸配列のアミノ酸表記は一般的な 1 文字表記にしたがった)。このアミノ酸配列を基に、デジネレイト・オリゴヌクレオチド・プライマーである、次の配列を有する 5' プライマー (5' プライマー-5 P-4)

**【0059】** [配列番号: 3]

5' - (C 又は G) G (A 又は C 又は G 又は T) (A 又は C 又は G) (A 又は C 又は G) (A 又は C 又は G 又は T) GC (A 又は T) GA (C 又は T) AT (A 又は C) (A 又は G) T (C 又は G) AT-3'

**【0060】** 及び次の配列を有する 3' プライマー (3' プライマー-3 P-2)

**【0061】** [配列番号: 4]

5' - (C 又は T) TC (A 又は G) T (C 又は G) (A 又は C 又は G 又は T) TC (A 又は G) TC (A 又是 G) AA (A 又是 G) TG (A 又是 G) (A 又是 G) (A 又是 C 又是 T) (A 又是 G) TC (C 又是 T) CC

**【0062】** を DNA シンセサイザ Model 1392 (Applied Biosystems) を使用し、β-シアノエチルフォスフォアミダイト法により合成了。上記配列中、括弧内に示された塩基はその複数の塩基を導入すること、そしてその結果マルチプルなヌクレオチド配列を生ずることを示している。括弧内複数の塩

基は合成時に混合塩基を用いて導入した。この時、プライマー-5 P-4 には 5' 側に BamH I サイト、プライマー-3 P-2 には 3' 側に EcoRI サイトを導入した。得られたプライマー-5 P-4 およびプライマー-3 P-2 は  $1.0\text{mM}$  リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.8 で平衡化したニックカラム (Pharmacia) を用い精製し、 $260\text{nm}$  の吸光度を測定して  $20\ \mu M$  に調製したもの用いた。

**【0063】** 得られた PCR 産物を  $10\%$  アガロースゲル電気泳動で分離し、設定したプライマーから予想されるサイズ ( $90\sim120\text{bp}$ ) の PCR 産物、7 種類を抽出、精製した。精製した各 PCR 産物を BamH I 及び EcoRI で処理し、適当なプラスミド、例えば pBlue script™ や pUC18 などの BamH I、EcoRI サイトにサブクローニングした。例えば、 $10\ \mu l$  の PCR 産物を  $10\%$  ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離して確認し、約  $120\sim130\text{bp}$  の PCR 産物を、プラスミド pBlue script™ ベクターにサブクローニングした。 $1\ \mu l$  の PCR 産物、 $1\ \mu l$  の  $10\times$  ライゲーション緩衝液、 $2\ \mu l$  の再懸濁化ベクター液及び  $1\ \mu l$  の T4 DNA リガーゼからなる反応用混合物を  $12^\circ C$  で一晩インキュベーション処理した。得られたベクターを適当なコンペテント細胞 (例えば、大腸菌 HB101 や XL1-Blue のコンペテント細胞が使用できる) に TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従い導入し、サブクローニングした。そのほか pUC119, pCR™ などのベクターを用いることもできる。クローニングした PCR 産物の塩基配列を蛍光 DNA シーケンサ Model 373A (Applied Biosystems)、Taq 大イプライマーサイクルシークエンシングキット (Applied Biosystems) を使用し決定した。

**【0064】** 決定したこれら 7 種の PCR 産物の塩基配列を既知 MMP の塩基配列と比較した結果、2 つは既に報告されている MMP-2 の塩基配列 (J. Biol. Chem., 261:6600~6605, 1986) の一部と、1 つは MMP-9 の塩基配列 (J. Biol. Chem., 264:17213~17221, 1989) の一部と一致した。残りの 4 種の PCR 産物の内、2 つは MMP とは無関係な塩基配列であったが、後の 2 つは  $93\text{bp}$  で同一の配列を有しており、MMP 遺伝子と相同性を示し推定されるアミノ酸配列も保存されていた。この PCR 産物を便宜的に MMP-X2 フラグメントと命名した。

**【0065】** (c) cDNA ライブライマーからの新規 MT-MMP-3 遺伝子のスクリーニングと塩基配列の決定

前項 (b) で得られた MMP-X2 フラグメント (cDNA 断片)  $2.5\text{ng}$  を、例えばランダムプライム DN A ラベリングキット (Boehringer Mannh

(19)

特開平9-87299

35

a i m) を使用して [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] d C T P (Amersham) を用いて標識し、2~5. 0 CPM/ $\mu$ gの比活性を持つプローブを得た。これを種々のヒト組織または細胞由来c D N Aライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして用いた。(a) 項で記載した  $\lambda$  g t 1 1 中に構築したヒト口腔癌組織c D N Aライブラリーを宿主菌大腸菌Y 1 0 9 0に $4 \times 10^4$  プラーク形成単位/ $15 \text{ cm}^2$  プレートの濃度で感染させ、プラークを形成させた。まず、大腸菌Y 1 0 9 0株を0. 0 2 %マルトースを含むL培地で1晩培養後、集菌し、10 mM M g S O<sub>4</sub>に懸濁した。この細胞懸濁液とファージ液を混合し37°C 15分間保温し、ファージを宿主菌に吸着させた。これに軟寒天を加え、予め作製しておいた15 c m<sup>2</sup> のLプレート上に広げた。プレートを42°Cで1晩保温し、プラークを形成させた後、ナイロンフィルター(例えば、ハイボンド(Hy bond)-N, Amersham)あるいはニトロセルロースフィルター(例えばHATF, Millipore)をプレート上に置き、約30秒間放置した。膜を穏やかに剥がしアルカリ変性液(0. 5 M NaOH及び1. 5 M NaCl)に1分間浸した後、中和液(1. 5 M NaCl含有0. 5 M Tris-HCl緩衝液, pH 8)に15分間浸した。このフィルターを2×S S P E (0. 36 M NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及び2 mM EDTA)で洗浄した後、風乾した。上述のプラークのフィルターへの転写を繰り返し、少なくとも2枚のフィルターを調製する。但し、2枚目以降のフィルターとプレートの接触時間は2分間程度に延長した。

【0066】このフィルターを80°Cで2時間ベーキングし、DNAを固定した。1つのプレートから調製した少なくとも2枚のフィルターをそれぞれ42°C、1時間洗浄液(1 M NaCl, 1 mM EDTA及び0. 1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 含有50 mM Tris-HCl緩衝液, pH 8. 0)で洗浄後、ハイブリダイゼーションバッグ中にフィルターを入れ、プレハイブリダイゼーション溶液[50% formamide, 5×Denhardt's溶液(0. 2%ウシ血清アルブミン、0. 2% polyvinyl pyrrolidone)、5×S S P E、0. 1% SDS、100  $\mu$ g/ml熱変性サケ精子DNA]に浸し、42°Cで6~8時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に100°C、5分間加熱変性させた(c) 項で記載した<sup>32</sup>P標識プローブをプレハイブリダイゼーション溶液に添加し、42°Cで1晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、フィルターを室温で多量の0. 1% SDS含有2×S S C 溶液で洗浄した。次にフィルターを0. 1% SDS含有の0. 2×S S C 溶液中に55°C、30分間置いた。この操作を2回繰り返したこのフィルターを風乾した後、X線フィルム(Kodak XR)と重ね-8

-50-  
-計 20-

36

0°Cで12時間オートラジオグラフィーを行った。X線フィルムを現像し、1枚のプレートからできた2枚のフィルムを重ね、重なるシグナルをマークする。マークしたシグナルに相当するプラークをSM溶液(100 mM NaCl及び10 mM MgSO<sub>4</sub>含有50 mM Tris-HCl緩衝液, pH 7. 5)に懸濁した。このファージ懸濁液を適度に希釈して、好ましくは10~100 プラーク形成単位/ $10 \text{ cm}^2$  プレートの濃度に希釈して大腸菌を培養してある $10 \text{ cm}^2$  プレートにプレーティングし、上記と同様のスクリーニングを行い、組換え体ファージを得た。

【0067】(d) 新規MT-MMP-3遺伝子を持つ組換え体  $\lambda$  g t 1 1 DNAの調製  
クローニングしたファージをそれぞれ前(c) 項の記載と同様にプレーティングし42°C、3時間保温し、続いて37°C、1晩保温した後SM溶液に数滴のクロロホルムを加え室温で30分間放置した。SM溶液と共に上層の軟寒天を搔き取り、遠心分離した。遠心後の上清に終濃度10%になるようにポリエチレンリコール-6000 (PEG-6000)を加え攪拌した後、4°Cで1時間放置した。これを遠心分離し上清を捨て、ファージ粒子を回収した。このファージ粒子をSM溶液に懸濁し、グリセロールグラジェント超遠心分離法(Molecular cloning, a laboratory manual, Ed. T. Maniatis, Cold Spring Harvour Laboratory, 2nd Ed. 78, 1989)により精製した。得られたファージをTM溶液に懸濁し、DNase IおよびRNase Aで処理後、20 mM EDTA、50  $\mu$ g/ml Proteinase K及び0. 5% SDS混合液を加え65°C、1時間保温した。これをフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させた。得られたDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液(10 mM EDTA含有10 mM Tris-HCl緩衝液、pH 8)に溶解した。

【0068】(e)挿入断片の塩基配列決定  
前項(d)で調製した  $\lambda$  g t 1 1 DNAをEco RIで分解し、挿入断片を分離精製後、ベクターp Blue script<sup>TM</sup> (Stratagene)のEco RI部位にサブクローニングする。この組換え体p Blue scriptで大腸菌NM533 XL1-Blueを形質転換した。形質転換細胞をF'選択後、ヘルペスマージVCSM13 (Stratagene)を感染させ終夜培養する。培養液を遠心分離し菌体を除き、これにPEG/NaClを加えファージを沈殿させる。沈殿をTE溶液に懸濁後、1本鎖DNAをフェノール抽出、エタノール沈殿により回収した。この1本鎖DNAの塩基配列を蛍光DNAシーケンサModel 373A (Applied Biosystems)、Taqダイプ

(20)

特開平9-87299

37

ライマーサイクルシークエンシングキット (Appled Biosystems) を使用し決定した。決定した塩基配列の全長は 2107 bp であり、その配列は配列表の配列番号：1 に記載した。GENBANK/EMBL DNA Data Base を使用し、配列表の配列番号：1 に記載した塩基配列を検索したが、同一の配列は存在しなかった。この約 2.1 kb の DNA 配列中には、推定 604 アミノ酸をコードするオープンリーディングフレームの存在が認められ、その推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号：2 に記載した。この推定されるタンパク質を、「MT-MMP-3」と名付けた。得られた DNA 断片をプラスミド PEX, pME Mneo, pKG などのベクターに組込み、大腸菌、CHO 細胞などで発現させることができる。上記 MT-MMP-3 をコードする塩基配列を挿入したベクター (pSG5<sup>n</sup> (Stratagene)) を保有する大腸菌 NM533 XL1-Blue (XL1-Blue/MMP-X2) は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5573 として寄託保存されている（平成 7 年 7 月 5 日（原寄託日）に寄託された微生物研菌寄第 P-15033 号（原寄託）よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求が平成 8 年 7 月 1 日にされた）。

#### 【0069】(f) MT-MMP-3 のアミノ酸配列解析

配列表配列番号：1 に記載の MT-MMP-3 の塩基配列から推定される配列表配列番号：2 に記載したアミノ酸配列を既知の MMPs のアミノ酸配列と比較したアライメントを図 1～図 5 に示した。配列表配列番号：2 に示したアミノ酸配列は、MMP ファミリーと高い相同性を示し、MMP ファミリーに特徴的なドメイン構造、すなわち、分泌産生時に除去されるシグナルペプチド、プロペプチドドメイン、触媒ドメイン、ヒンジドメイン、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインが良好に保存されていた。特に、MMP ファミリーで非常に高度に保存されているプロ体と活性型の切断部位近傍の配列 P R C G V P D は MT-MMP-3 でも完全に保存されており、また活性ドメインの配列も高い保存性を示した。Zn<sup>2+</sup> の結合部位を含む活性ドメインのアミノ酸配列を MT-MMP-3 と他の既知の MMP と比較したところ、MT-MMP-1 に対する相同性は 66% と最も高く、また他の MMP に対する相同性も MMP-12 に対して 51%、MMP-2 及び MMP-9 に対して 50%、MMP-1 に対して 49%、MMP-3 に対して 48%、MMP-8 に対して 47%、MMP-11 に対して 46%、MMP-7 に対して 44% の相同性を示した。

【0070】さらに MT-MMP-3 のアミノ酸配列上で他の MMP と比較して特徴的な点は、3ヶ所の挿入配列が存在する点である。すなわち、プロペプチドドメインと触媒ドメインの間に存在する G S S K F H I R R K

38

R の配列からなる 11 アミノ酸残基の挿入配列-1 (IS-1；配列表の配列番号：2 の G l y<sup>109</sup> ~ A r g<sup>119</sup>)、触媒ドメイン中の P Y S E L E N G の配列からなる 8 アミノ酸残基の挿入配列-2 (IS-2；配列表の配列番号：2 の P r o<sup>171</sup> ~ G l y<sup>178</sup>) 及びransmenblendomain 様の 24 個の疎水性アミノ酸の連続配列 A I A I V I P C I L A L C L L V L V Y T V F Q F を含む 75 アミノ酸残基の挿入配列-3 (IS-3；配列表の配列番号：2 の A s p<sup>520</sup> ~ V a l<sup>521</sup>) が存在する。このような 3ヶ所の挿入配列は、MMP ファミリー中では MT-MMP-1 においてのみ存在し、他の MMP には認められなかった。MT-MMP-3 における 3ヶ所の挿入配列について位置及び構成するアミノ酸残基の数は、MT-MMP-1 におけるそれほどほとんど同じであったが、アミノ酸の組成は、MT-MMP-1 のそれとは明らかに異なっており、IS-3 の MT-MMP-1 との相同性は 37% であった。なお、全配列の相同性は 43% であった。最初の挿入配列 IS-1 は例外的に MMP-11 にも存在しているが、IS-1 中で保存されている配列 R X K R は、ズブチリシン様プロテアーゼの切断部位の配列であり、アミノ酸配列 R X K R はズブチリシン様プロテアーゼによる多くの真核生物分泌タンパク質の切断部位であることが知られている (J. Biol. Chem., 266: 12127~12130, 1991)。IS-3 中の疎水性アミノ酸の連続配列は transmenblendomain と考えられ、MT-MMP-1 の際立って特徴的な点であり (J. Biol. Chem.: 270, 801~805, 1995)、MT-MMP-3 の IS-3 中に存在する疎水性アミノ酸の連続配列も transmenblendomain と考えられた (実施例 5 参照)。本発明により単離された MT-MMP-3 cDNA によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列は、他の MMP ファミリーと相同性が高く、先に本発明者らが見出した MT-MMP-1 とも類似しているが、詳細な点では明らかに異なり、また分子量も異なっていた。本発明のタンパク質は約 69 kDa の分子量を有している。これらの配列上の特徴は、MT-MMP-1 及び MT-MMP-3 は、MMP ファミリー中のサブファミリーを構成していることを示唆している。

#### 【0071】実施例 2 MT-MMP-3 mRNA の発現

##### (a) ヒト組織中の発現

ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓各組織由来の poly(A)<sup>+</sup> RNA をプロットしてあるメンブレン Human Multiple Tissue Northern Blots (Clontech) を用い、<sup>32</sup>P 標識した実施例 1 (e) 項に記載した 2.1 kb の cDNA をプローブとしてノーザン blotting を行った。プローブの標識は実施例 1 (c) 項

(21)

特開平9-87299

39

の記載と同様に行った。3×SSC (0.45M NaCl, 0.045M trisodium citrate 2HzO, pH 7.0) で湿らせた Multiple Tissue Northern Blots のフィルターをプレハイブリダイゼーション溶液 (0.75M NaCl, 2.5mM EDTA, 0.5×Denhardt's 液、50% formamide 及び 1% SDS 含有 20mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5) 10ml 中で穏やかに攪拌しながら 42°C で 2~3 時間プレハイブリダイズした。次にハイブリダイゼーション溶液 (プレハイブリダイゼーション溶液に 10% sodium dextran, 20 μg/ml I 型性サケ精子 DNA を加えた溶液) 10ml に熱変性したプローブを加えプレハイブリダイゼーション溶液と交換し、43°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、0.1% SDS 含有 2×SSC 液で洗浄した。

【0072】次にプロットを 0.1% SDS 含有 1×SSC 液中に 55°C、30 分間置いた。このプロットをバイオイメージアナライザ BIAS 1000 (富士写真フィルム株式会社) でトレースし各組織における mRNA の発現強度を評価した。このとき、同じプロットを <sup>32</sup>P 標識した Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子 (CLONTECH) を用いてプロービングし、mRNA の内部標準とした。その結果を図 6A に示した。MT-MMP-3 mRNA のサイズは、何れの組織でも 12 kb であり、調べた組織中、肺、脳、胎盤で高い発現を認めたが、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、骨格筋では検出されなかった。一方、同様に Human Multiple Tissue Northern Blots (Clontech) を用い、<sup>32</sup>P 標識した MT-MMP-1 cDNA をプローブとしてノーザンプローティングを行ったところ、4.5 kb に検出された MT-MMP-1 mRNA は、肺、腎臓、胎盤で顕著に発現していたのに対し脳では最も低い発現であった。因みに、MT-MMP-1 と MT-MMP-3 のクロスハイブリダイゼーションは生じなかった。

#### 【0073】(b) 培養癌細胞中の発現

種々ヒト培養癌細胞中の MT-MMP-3 mRNA の発現を検討した。ヒト癌細胞として、喉頭癌由来細胞 HEp 2、膀胱癌由来細胞 T24、肺癌由来細胞 PC-3、胃癌由来細胞 KLLS、NKP-S 及び MKN-2 8、骨肉腫由来細胞 SK-E-S-1 及び U-250S、扁平細胞癌由来細胞 OSC-19 及び悪性黒色腫細胞 A375、線維芽細胞として胎児肺由来線維芽細胞 HEL を使用した。各細胞から抽出した RNA、1 植体につき 10 μg を 50% formamide、17.5% formalin 含有 2% MOPS、pH 7.5 に溶解し、65°C で 10 分間反応させた。これを 1% アガロースで 2

40

% MOPS 中で電気泳動を行った。泳動後のゲルを、ナイロンメンブレン (例えば、Hybond-N, Amersham) に転写した。転写後のメンブレンを波長 254 nm の紫外線を 1200 マイクロジュール照射し、固定した。このプロットを前項 (a) と同じく <sup>32</sup>P 標識した cDNA と 16 時間ハイブリダイゼーションを行い、バイオイメージアナライザ BIAS 1000 (富士写真フィルム株式会社) でトレースし、シグナルの検出、強度を評価した。MT-MMP-3 mRNA は、T10 24 細胞及び HeLa 細胞で他の細胞より高い発現が検出されたが、これらの細胞における MT-MMP-1 mRNA の発現レベルは低レベルであった。一方、MT-MMP-1 mRNA の顕著な発現を認めた OSC-19 細胞及び HEL 細胞では逆に MT-MMP-3 mRNA の発現は他の細胞に比べ低レベルであった (図 6B)。MT-MMP-1 及び MT-MMP-3 は、そのアミノ酸配列の比較から極めて類似したドメイン構造を有し、またプロ MMP-2 の活性化という同じ作用を有しているにも拘らず (実施例 6 参照)、その発現は、組織あるいは細胞レベルでは全く異なるパターンを示した。このことは、MT-MMP-1 と MT-MMP-3 が類似した構造及び作用を有するにも拘らず、異なる発現制御を受けていることを示している。

#### 【0074】実施例 3 モノクローナル抗体の調製

##### (a) 抗原ポリペプチドの調製

配列表の配列番号：2 に記載した MT-MMP-3 のアミノ酸配列中より他の MMP ファミリーとの相同性が低い、MT-MMP-3 に特徴的な配列として、次の 4 個の配列を選択し、合成した。

##### 30 【0075】[配列番号：5]

QTRGSSKFHIRRKR  
(配列表配列番号：2 の Gln<sup>105</sup> ~ Arg<sup>119</sup> の配列；「ポリペプチド A」と略記する)

##### [配列番号：6]

E EVPYS E L E N G K R D  
(配列表配列番号：2 の Glu<sup>168</sup> ~ Asp<sup>181</sup> の配列；「ポリペプチド B」と略記する)

##### [配列番号：7]

PTSPRMSVVRS AETMQSA  
(配列表配列番号：2 の Pro<sup>55</sup> ~ Ala<sup>72</sup> の配列；「ポリペプチド C」と略記する)

##### [配列番号：8]

TLCNPNHGDNDLF  
(配列表配列番号：2 の Thr<sup>29</sup> ~ Leu<sup>212</sup> の配列；「ポリペプチド D」と略記する)

【0076】これらのポリペプチドをペプチド合成機 (ペプチドシンセサイザー 9600, Milligen / Bioscience) を使用して、Fmoc-bop 法で合成した。ポリペプチドの N 末端にはシステインを導入した。合成したペプチドは μBondaspher

(22)

特開平9-87299

41

e, C 18カラム (Waters) を用いた高速液体クロマトグラフィーにより精製した。

【0077】(b) 各ポリペプチドとBSAの複合体の調製

システイン残基を介してウシ血清アルブミン (BSA) と結合させ抗原コンジュゲートとした。20mg BSA を2mlの0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解したものと18.13mg N-(6-maleimidocaproyloxy)succinimide を200μlのジメチルホルムアミドに溶解したものと混合し、30℃、30分間反応させた。ついで、上記の混合液を0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したPD-10 (Pharmacia) でゲルろ過した。マレイミドが結合したBSAを分取し、1.5ml以下に濃縮した。マレイミドが結合したBSAに対し50倍モル量の前記(a)で合成した各ポリペプチドを1mlの0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものとそれと混合し、4℃、20時間インキュベートし、BSA-ポリペプチド複合体を調製した。

【0078】(c) 抗体産生細胞の調製

前記(b)で調製した4種類のポリペプチドA、B、C 及びDとBSAとの複合体それぞれ200μgを完全フロイントアジュバントと共に8週令Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫した。18日後に0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した各複合体200 μgをそれぞれの初回免疫したマウスに腹腔内投与し、追加免疫した。さらに32日後に追加免疫時と同様に各複合体100μgを静脈内投与し、最終免疫とした。その3日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。

【0079】(d) 細胞融合

(1) 以下の材料および方法を用いた。

RPMI-1640培地: RPMI-1640 (Flow Lab.) に重炭酸ナトリウム (24mM)、ピルビン酸ナトリウム (1mM)、ペニシリングカリウム (50U/ml)、硫酸アミカシン (100μg/ml) を加え、ドライアイスでpHを7.2にし、0.2 μm東洋メンブレンフィルターで除菌ろ過した。

NS-1培地: 上記RPMI-1640培地に除菌ろ過したFCS (M. A. Bioproducts) を15% (v/v) の濃度になるように加えた。

PEG4000溶液: RPMI-1640培地にポリエチレングリコール4000 (PEG 4000, Merck & Co.) を50% (w/w) になるように加え、無血清溶液を調製した。

8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2 (SP2/0-Ag14) との融合は、Selected Method in Cellular Immunology pp351~372 (ed. B. B. Mishell and S. N. Shiigi)、W. H. Freeman and Company (1980) に記載のOিらの方法を若干改変して行った。

42

【0080】(2) 以下では、ポリペプチドA-BSA

複合体で免疫したマウス由来の有核脾細胞とミエローマ細胞SP2との融合に関して詳述する。前記(c)で調製した有核脾細胞 (生細胞率100%) それぞれとミエローマ細胞 (生細胞率100%) とを5:1の比率で以下の手順で融合した。ポリペプチドA脾細胞懸濁液とミエローマ細胞をそれぞれRPMI1640培地で洗浄した。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞1.1×10<sup>9</sup>個とミエローマ細胞2.1×10<sup>8</sup>個

10 を混合した。次に遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去した。沈殿した細胞に37℃に加温したPEG4000溶液 (50% (w/v) ポリエチレングリコール4000含有RPMI1640培地) 7.1 mlを1分間で滴下し、1分間攪拌し、細胞を再懸濁、分散させた。次に37℃に加温したRPMI1640培地14.2mlを2分間で滴下した後、同培地49.7 mlを2~3分間に常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させた。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去した。

20 次にこの沈殿した細胞に37℃に加温したNS-1培地 [除菌ろ過した15% (w/v) 仔牛胎児血清 (JRH Biosciences) 含有RPMI1640培地] 7.1mlを速やかに加え、大きい細胞塊を注意深くピッティングで分散した。さらに同培地14.2mlを加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウェルにウェル当たり6.0×10<sup>5</sup>個/0.1mlの細胞を加えた。細胞を加えた上記マイクロウェルを7%炭酸ガス/93%空気中で温度37℃、湿度100%で培養した。ポリペプチドB-BSA複合体で免疫したマウス由

30 来脾細胞の場合では、脾細胞6.2×10<sup>8</sup>個とミエローマ細胞1.24×10<sup>8</sup>個を混合し、上記で使用したPEG4000溶液、RPMI1640培地、NS-1培地をそれぞれ4.1ml、36.9ml、123ml用いた。ポリペプチドC-BSA複合体で免疫したマウス由来の脾細胞の場合、脾細胞3.6×10<sup>8</sup>個とミエローマ細胞7.5×10<sup>7</sup>個を混合し、PEG4000溶液、RPMI1640培地、NS-1培地をそれぞれ2.5ml、22.5ml、75ml使用した。ポリペプチドD-BSA複合体で免疫したマウス由来の脾細胞の場合、脾細胞6.0×10<sup>8</sup>個とミエローマ細胞1.2×10<sup>8</sup>個を混合し、PEG4000溶液、RPMI1640培地、NS-1培地をそれぞれ4.0ml、36.0ml、120ml使用した。

40 【0081】(e) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

(1) 使用する培地は以下の通りである。

HAT培地: 前記(d) (1)で述べたNS-1培地に更にヒポキサンチン (100μM)、アミノブテリン (0.4μM) およびチミジン (16μM) を加えた。

HT培地: アミノブテリンを除去した以外は上記HAT

(23)

特開平9-87299

43

培地と同一組成のものである。

(2) 前記(d)の培養開始後翌日(1日目)、細胞にパストールピペットでHAT培地2滴(約0.1ml)を加えた。2、3、5、8日目に培地の半分(約0.1ml)を新しいHAT培地で置き換え、11日目に培地の半分を新しいHT培地で置き換えた。14日目にハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウエルについて固相-抗体結合テスト法(ELISA)により陽性ウエルを調べた。すなわち、ポリスチレン性96穴プレートを抗原としたポリペプチドA、B、CおよびDそれぞれでコートし、次に洗浄用PBS(0.05%Tween 20含有)を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除いた。さらに各ウエルの未コート部分を1%BSAでブロックした。この各ウエルにハイブリドーマの生育が確認されたウエルの上清0.1mlを添加し、室温で約1時間静置した。2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン(Capel Lab.)を加え、さらに室温で約1時間静置した。次に基質である過酸化水素とo-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRPA4、東ソー)を用いて492nmの吸光度で測定した。

【0082】(f)ハイブリドーマのクローニング  
上記(e)で得られた各抗原ペプチドに対する陽性ウエル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローン化した。すなわち、NS-1培地1ml当りフィーダーとして10<sup>7</sup>個のマウス胸腺細胞を含むクローニング培地を調製し、96穴マイクロウエルにハイブリドーマをウエル当り5個、1個、0.5個になるように希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加えた。5日目、12日目に全ウエルに約0.1mlのNS-1培地を追加した。クローニング開始後約2週間で、肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認め、コロニー形成陰性ウエルが50%以上である群について(e)に記載したELISAを行った。調べた全ウエルが陽性でない場合、抗体陽性ウエル中のコロニー数が1個のウエルを4~6個選択し、再クローニングを行った。最終的に表1~表4にまとめて示したように各ポリペプチドA、ポリペプチドB、ポリペプチドCまたはポリペプチドDに対するモノクローン抗体を产生するハイブリドーマがそぞれぞれ7個、16個、11個、4個得られた。

【0083】(g)ハイブリドーマの培養とモノクローン抗体の精製

得られた各ハイブリドーマ細胞をNS-1培地で培養し、その上清から濃度10~100μg/mlのモノクローン抗体を得ることができた。また、得られたハイブリドーマ10<sup>7</sup>個を予め1週間前にプリスタンを腹腔内投与したマウス(BALB/c系、♀、6週齢)に同じく腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも4~7mg/mlのモノクローン抗体を含む腹水を得ること

50

ができた。得られた腹水を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、1gGクラスの抗体をプロテインAアフィゲル(Bio-Rad)に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液(pH5)で溶出することにより精製した。

(h)モノクローナル抗体のクラス、サブクラスの決定  
前述したELISAに従い、各ポリペプチドA、ポリペプチドB、ポリペプチドCまたはポリペプチドDをコートしたマイクロタイトレーションプレートに、(f)で得られたモノクローンの上清を加えた。次にPBSで洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG抗体(Zymed Lab.)を加えた。PBSにより洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)を加え、基質として過酸化水素および2,2'-アジノージ(3-エチルベンゾチアゾリン酸)を用いてクラス、サブクラスを決定した。最終的に表1~表4に示したようにMT-MMP-3に対するモノクローン抗体産生ハイブリドーマを得た。

【0084】

【表1】

表1

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス/鎖
A	116-1E7	γ1/κ
	116-2G6	γ1/κ
	116-6A11	γ1/κ
	116-7B2	μ/κ
	116-10E10	μ/κ
	116-11B2	μ/κ
	116-12E3	μ/κ

【表2】

表2

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス/鎖
B	117-1F6	γ1/κ
	117-2H5	γ1/κ
	117-3B9	γ1/κ
	117-4E1	γ1/κ
	117-5A6	γ1/κ
	117-6C11	γ1/κ
	117-9H5	γ1/κ
	117-10C6	γ1/κ
	117-13B6	γ2a/κ
	117-14E3	γ1/κ
	117-15C5	γ1/κ
	117-16E10	γ1/κ
	117-17E10	γ2b/κ
	117-18D9	γ1/κ
	117-19D1	γ1/κ
	117-20B3	γ1/κ

【0085】

【表3】

(24)

特開平9-87299

表 3

45

ポリペプチド	モノクローナル抗体番号	サブクラス/鎖
C	157-3G4	γ1/κ
	157-4A5	γ2b/κ
	157-6F5	γ1/κ
	157-11E1	μ/κ

【0086】

【表4】

表 4

46

ポリペプチド	モノクローナル抗体番号	サブクラス/鎖
D	158-2D6	γ2a/κ
	158-3B12	γ2a/κ
	158-8E6	γ1/κ
	158-9F6	γ2b/κ
	158-11D10	μ/κ
	158-16F12	γ1/κ
	158-17F1	γ1/κ
	158-18D8	γ1/κ
	158-19F10	γ1/κ
	158-20D5	γ2a/κ
	158-21F11	γ1/κ

なお、クローン番号 117-4E1は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 5 7 2として寄託保存されている(平成7年7月5日(原寄託日)に寄託された微研菌寄第P-15031号(原寄託)よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求が平成8年7月1日にされた)。

#### 【0087】(i) 抗MT-MMP-3モノクローナル抗体の特異性

ヒト新生児線維芽細胞(N B I R C B)の培養上清中からそれぞれ精製した潜在型MMP-1(Clin. Chim. Acta, 219: 1~14, 1993)、潜在型MMP-2(Clin. Chim. Acta, 221: 91~103, 1993)及び潜在型MMP-3(Clin. Chim. Acta, 211: 59~72, 1992)、ヒト直腸癌細胞(CaR-1)の培養上清から精製した潜在型MMP-7(Cancer Research, 50: 7758~7764, 1990)、ヒト好中球より精製した潜在型MMP-8(Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 371: Supplement 295~304, 1990)並びにヒト線維芽細胞腫株(HT1080)の培養上清から精製した潜在型MMP-9(J. Biol. Chem., 267: 21712~21719, 1992)をそれぞれ抗原として使用し、前述の(e)に記載した固相-抗体結合テスト法(ELISA)によりヒトMT-MMP-3ペプチドと陽性反応を示す抗MT-MMP-3モノクローナル抗体(モノクローン番号117-4E1、157-6F5及び158-8E6)の交差反応性を調べた。すなわち、ポリスチレン製96穴プレートを使用し、各ウェ

ルに精製した各MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8及びMMP-9をそれぞれ50ng/wellで加えコートした。洗浄用PBSで洗浄し未吸着の抗原を除去した後、各ウェルの未コート部分を3%スキムミルク含有PBSでブロックした。この各ウェルに各抗MT-MMPモノクローナル抗体それぞれを1μg/wellで加え、室温で約1時間静置した。プレートを洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加えさらに室温で約1時間反応させた。次に基質である過酸化水素とo-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492nmの吸光度で測定した。その結果、抗MT-MMP-3モノクローナル抗体は何れも、供試したMT-MMP-3以外の精製MMPsと反応性を示さなかった。本実施例3の方法を、合成ペプチド抗原の代わりにリコピナントMT-MMP-3、例えば下記実施例4あるいは5の方法で得られたリコピナントMT-MMP-3を抗原として用いることにより繰り返し、同様にして抗MT-MMP-3モノクローナル抗体を作製する。

【0088】実施例4 遺伝子産物の発現と同定  
動物細胞を宿主としてMT-MMP-3を発現させるため、cDNAを発現ベクターと連結した。本実施例では、発現用ベクターにはSV40のプロモーター、エンハンサー、ポリアシグナル、small T antigen遺伝子の介在配列を含むpSG5(Stratagene)を用いた。実施例1(e)で構築したMT-MMP-3遺伝子をクローニングした組換えpBluescript<sup>n</sup>(Stratagene)からEcoRI 20 切断により2.1kbの挿入断片を切り出し、真核細胞用発現ベクターpSG5のEcoRIサイトにクローニングし、発現用プラスミドpSGMT2を作製した。ライゲーション反応は、ライゲーションキットに添付のプロトコールに従って行った。5%ウシ胎児血清及び2mM glutamineを含むダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM)中で培養したアフリカミドリザル腎由来細胞COS-1にpSGMT2

30 及びpSGT1(TIMP-1 cDNAをpSG5にクローニングしてあるもの)をリン酸カルシウム法によりコトランスクレクションした(Virology, 52: 456, 1973)。対照として、pSG5単独でCOS-1をトランスクレクションした。すなわち、蒸留水に2μgの組換えpSG5あるいはpSG5単独に、60μlの0.25M CaCl<sub>2</sub>を加え、次に2×BS溶液(2.8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>及び280mM NaCl含有50mM BES緩衝液、pH 7.9)62.5μlをチューブの底に加えた。これを混合後、室温で30分程度放置し、沈殿形成を十分行った。沈殿を50 ピッティングにより分散し、COS-1細胞に滴下し

(25)

特開平9-87299

47

た後、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で約24時間インキュベートした。次に培地を除き、細胞をPBSで洗浄後、30 μCi/mIの<sup>35</sup>S-メチオニンを含む新鮮なメチオニン不含DMEMを加えた。培養を5時間継続し、細胞タンパク質を<sup>35</sup>Sで標識した。

【0089】遠心分離により細胞とコンディション培地を分離し、細胞を溶解緩衝液(0.15M NaCl、0.1% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、1 mM Triton X-100、1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 含有10 mM Tris-HCl緩衝液、pH 7.5) 中で4°C、1時間インキュベートした。細胞溶解液を遠心分離し、上清を回収した。上清及びコンディション培地を実施例3で得られた抗MT-MMP-3ポリペプチド抗体clone Nos. 117-4E1あるいは117-13B6、また対照として抗TIMP-1抗体clone No. 50-1H7と4°C、16時間反応させた。clone Nos. 117-4E1あるいは117-13B6抗体は、抗MT-MMP-3モノクローナル抗体の中でも非特異的反応性の低いものとして選択した。これらの抗原-抗体複合体にプロテインAをカップリングさせたセファロース-4B (Pharmacia) を加え、4°Cで2時間攪拌しながらインキュベートし、免疫沈降を行った。次に、遠心分離により免疫沈降させたモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4Bを沈殿させ、細胞溶解液で3回洗浄し、最後に0.05M Tris-HCl緩衝液、pH 6.8で洗浄した。この洗浄したセファロース-4BにSDSポリアクリルアミド電気泳動用サンブル緩衝液(10% glycerol、2% SDS、2% β-mercaptoethanol、0.1% bromophenol blue 含有50 mM Tris-HCl緩衝液、pH 6.5)を加え、100°Cで3分間加熱した後、12% SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。バイオイメージアナライザーBAS 1000 (富士写真フィルム株式会社) を用いて泳動後のゲルのシグナルの検出を行い、その結果を図7に示した。

【0090】使用した抗MT-MMP-3ポリペプチド抗体clone Nos. 117-4E1及び117-13B6はいずれも、MT-MMP-3遺伝子をトランスフェクションした細胞のセルライゼート中の分子量64 kDaのタンパク質を免疫沈降した。対照としたMT-MMP-3遺伝子を含まないベクターpSG5単独をトランスフェクトした細胞では、何れの抗体でも分子量64 kDaタンパク質は免疫沈降されなかった。免疫沈降で検出されたタンパク質の分子量64 kDaは、配列表番号: 2に記載したアミノ酸配列から算出される分子量とほぼ一致した。また、分子量30、33及び

-26-

(25)

52 kDaに相当する3本のバンドがMT-MMP-3遺伝子をトランスフェクションした細胞のセルライゼート中から検出されたが、対照ではこれらのバンドは検出されなかった。一方、セルライゼートから免疫沈降されたこれらタンパク質は、コンディション培地中からは検出されなかった。これに対し、TIMP-1は分泌タンパク質であるが、実際、発現したTIMP-1は、その殆どがコンディション培地中に検出され、確かに細胞外に分泌されていることが確認された。以上の結果は、MT-MMP-3は、そのアミノ酸配列からシグナルペプチドの存在が示唆されるにも拘らず、容易に分泌されないことを示している。この知見は、MT-MMP-1が細胞表面で発現し培地中では検出できなかった先の本発明者らの知見 (Nature, 370; 61~65, 1994) と非常によく類似している。MT-MMP-3 cDNAは、mRNAから逆転写酵素により合成された完全長のcDNAであるので、このcDNAを適当な発現ベクターに移すことによって、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等を宿主としてMT-MMP-3を大量生産できる。pSGMT2をCOS-1に導入した本実施例では、MT-MMP-3の产生は短期的 (transient expression) であるが、適当な選択マーカー (neo遺伝子、dehydrofolate reductase遺伝子等) を有する発現ベクターを使用し、CHO細胞等に導入することにより長期間生産可能な細胞株を得ることもできる。

【0091】実施例5 MT-MMP-3のC末端疎水性アミノ酸連続配列の機能

(a) MT-MMP-3のC末端疎水性アミノ酸連続配列とTIMP-1とのキメラタンパク質 (TIMP/MT-3) 及びMT-MMP-3のC末端疎水性アミノ酸連続配列とTIMP-1とのキメラタンパク質 (TIMP/MT-1) の調製  
MT-MMPsのC末端疎水性アミノ酸連続配列とTIMP-1とのキメラタンパク質の調製は、CaoらのMT-MMP-1のトランスメンブレンドメインとTIMP-1とのキメラタンパク質の調製法 (J. Biol. Chem., 13; 801~805, 1995) に準じて行った。MT-MMP-3のC末端疎水性アミノ酸連続配列を含むアミノ酸配列 (Ala<sup>556</sup> ~ Val<sup>601</sup>) をコードするcDNA断片、あるいはMT-MMP-1のC末端疎水性アミノ酸連続配列を含むアミノ酸配列 (Gly<sup>533</sup> ~ Val<sup>582</sup>) をコードするcDNA断片をPCRにより増幅し、断片を回収した。PCR増幅は、実施例1(b)と同様にして行った。得られたDNA断片それをTIMP-1 cDNAの3'末端側に連結し、pSG5にサブクローニングすることによりTIMP-1/MT-3キメラタンパク質発現プラスミドpSGT1M2及びTIMP-1/MT-1キメラタンパク質発現プラスミドpSGT1M1を作製した。ライ

(26)

特開平9-87299

49

50

ゲーション反応は、ライゲーションキットに添付のプロトコールに従って行った。これらのプラスミドのCOS-1へのトランスフェクションは実施例4に記載と同様に行なった。5%ウシ胎児血清及び2 mM glutamineを含むDMEM中で培養したCOS-1にpSGT1M2、pSGT1M1あるいはpSGT1それぞれをリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。対照として、pSG5単独でCOS-1をトランスフェクションした。すなわち、2 μgのプラスミドDNAに、60 μlの0.25M CaCl<sub>2</sub>を加え、次に2×BBS溶液(2.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>及び280 mM NaCl含有50 mM BES緩衝液、pH 7.9)62.5 μlをチューブの底に加えた。これを混合後、室温で30分程度放置し、沈殿形成を行なった。沈殿をピペットtingにより分散し、COS-1細胞に滴下した後、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で約24時間インキュベートした。次に培地を除き、細胞をPBSで洗浄後、<sup>35</sup>S-メチオニンを含む新鮮なメチオニン不含DMEMを加えた。培養を5時間継続し、細胞タンパク質を<sup>35</sup>Sで標識した。

【0092】遠心分離により細胞とコンディション培地を分離し、細胞は溶解緩衝液(0.15 M NaCl、0.1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、1 mM Triton X-100、1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM PMSF含有10 mM Tris-HCl緩衝液、pH 7.5)中で4°C、1時間インキュベートした。細胞溶解液を遠心分離し、上清を回収した。上清及びコンディション培地を実施例3で得られた抗TIMP-1抗体clone No. 50-1H7と4°Cで16時間反応させた。得られた抗原-抗体複合体にプロテインAをカップリングさせたセファロース-4B(Pharmacia)を加え、4°Cで2時間攪拌しながらインキュベートし、免疫沈降を行なった。次に、遠心分離により免疫沈降させたモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4Bを沈殿させ、細胞溶解液で3回洗浄し、最後に0.05 M Tris-HCl緩衝液、pH 6.8で洗浄した。この洗浄したセファロース-4BにSDSポリアクリルアミド電気泳動用サンプル緩衝液(10% glycerol、2% SDS、2% β-mercaptoethanol、0.1% bromophenol blue含有50 mM Tris-HCl緩衝液、pH 6.5)を加え、100°Cで3分間加熱した後、12% SDSポリアクリルアミド電気泳動を行なった。バイオイメージアナライザ-BAS1000(富士写真フィルム株式会社)を用いて泳動後のゲルのシグナルの検出を行なった。TIMP-1、TIMP-1/MT-1、TIMP-1/MT-3はセルライゼート中で、それぞれ28、32、32 kDaのタンパク質として検出された。検出されたキメラタンパク質TIMP-1/

MAT-1及びTIMP-1/MT-3の分子量は、融合遺伝子から推定される分子量と合致した。TIMP-1は、セルライゼート中でも検出されたが、その大半はコンディション培地中に検出された。一方、TIMP-1/MT-1は、セルライゼート中からのみ検出され、コンディション培地中からは検出されなかった(J. Biol. Chem., 13; 801~805, 1995)。これに対し、TIMP-1/MT-3はTIMP-1/MT-1と同様セルライゼートからのみ検出され、全く同じ局在を示した(図8)。これらの結果は、MT-MMP-3のC末端領域の疎水性アミノ酸連続配列がMT-MMP-1のC末端領域の疎水性アミノ酸連続配列と同様に融合タンパク質の細胞外への分泌を抑制していることを示している。

【0093】(b) 細胞表層でのキメラタンパク質の発現

MT-MMP-3のC末端領域の疎水性アミノ酸連続配列が実際にトランスメンブレンドメインとして機能しているかどうかを、TIMP-1/MT-3発現細胞の間接蛍光免疫染色により検討した。COS-1にpSGT1あるいはpSGT1M2を実施例4に記載の方法と同様にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。但し、本実施例では、アイソトープラベルした培地は使用せず、細胞はスライドチャンバー上で培養した。培養24時間後、細胞を5 μg/mlの抗TIMP-1抗体clone No. 50-1H7、3% BSA含有PBS中で37°Cで40分間反応させた。次に細胞を3%

BSA含有PBSで3回洗浄し、風乾後、95% アセトンで5分間固定した。続いて細胞を3% BSA含有PBSに浸し、1500倍に希釈したfluorescent isothiocyanate(FITC)標識ゴート抗(マウスIgG) IgG(Cape1)と37°Cで30分間反応させた後、ふたたび3% BSA含有PBSで過剰な抗体を洗浄した。最後にglycerinを重層し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、pSGT1M2を発現している細胞(キメラタンパク質TIMP-1/MT-3を発現している細胞)では、細胞表面に蛍光が観察され、キメラタンパク質のTIMP-1部分が細胞表層上で発現していることが確認された。

一方pSGT1を発現している細胞(キメラでないTIMP-1を発現している細胞)では蛍光は観察されず、細胞表層でのTIMP-1の発現は認められなかった(図9)。この結果は、MT-MMP-3のC末端の疎水性アミノ酸連続配列がトランスメンブレンドメインとして機能していることを示している。

【0094】実施例6 MT-MMP-3の発現による潜在型MMP-2の活性化  
実施例4で作製したMT-MMP-3 cDNAをクローニングしたプラスミドpSG5M2あるいはMT-MMP-1 cDNAをクローニングしたプラスミドpSG5M1

(27)

特開平9-87299

51

52

あるいはベクター p S G 5 それと、潜在型M M P - 2 をクローニングしたプラスミド p S C G A を、実施例 4 に記載したリン酸カルシウム法により C O S - 1 にコトランスフェクションした。ただし、<sup>35</sup> S - メチオニン含有新鮮培地の代わりに、通常の新鮮培地を使用した。また、ヒト線維芽細胞腫株 H T - 1 0 8 0 に、 p S G T 1 あるいは p S G T 2 あるいは p S G 5 それと、 p S C M 2 を、同様にコトランスフェクションした。H T - 1 0 8 0 は、潜在型M M P - 2 及び潜在型M M P - 9 を構成的に分泌しており（図 10 中の 6 8 K D a 及び 9 7 . 4 k D a のバンドにそれぞれ相当）、また、M T - M M P - 3 c D N A をトランスフェクションした細胞では、M T - M M P - 3 が発現していることを免疫沈降実験により確認した（実施例 4 参照）。得られたトランスフェクタントを無血清 D M E M 中で 2 4 時間培養し、回収した培養上清をザイモグラフィーにかけた。培養上清を S D S ポリアクリルアミド電気泳動用サンプル緩衝液（非還元； 1 0 % g l y c e r o l 、 2 % S D S 、 0 . 1 % b r o m o p h e n o l b l u e 含有 5 0 mM T r i s - H C l 緩衝液、 pH 6 . 5 ）と混和後 3 7 °C で 2 0 分間インキュベートした後、 0 . 1 % g e l a t i n 含有 1 0 % ポリアクリルアミドゲルを用い、電流 2 0 mA 、 4 °C で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを 2 . 5 % T r i t o n X - 1 0 0 溶液中で 1 時間ゆっくり振盪しながら洗浄し、次にゼラチナーゼ用緩衝液（ 1 0 mM C a C l <sub>2</sub> 、 0 . 1 5 M N a C l 、 0 . 0 2 % N a N <sub>3</sub> 含有 5 0 mM T r i s - H C l 、 pH 7 . 6 ）中で 3 7 °C で 2 4 時間ゆっくり振盪させながらインキュベートした。緩衝液を廃棄し、ゲルを 0 . 1 % c o o m a s s i e b r i l l i a n t b l u e R 2 5 0 （ 5 0 % メタノール - 1 0 % 酢酸に溶解）で 1 時間染色後、脱色液（ 5 % メタノール - 7 . 5 % 酢酸）に浸し脱色した。得られたザイモグラフィーの結果を図 10 に示した。

【 0 0 9 5 】 M T - M M P - 3 c D N A をトランスフェクションした C O S - 1 では、 M T - M M P - 1 c D N A をトランスフェクションした C O S - 1 と同様に、新たにそれぞれ活性中間体 M M P - 2 と活性型 M M P - 2 に相当する 6 4 k D a と 6 2 k D a のバンドが出現し、潜在型 M M P - 2 の活性化が確認された。一方、ベクター p S G 5 をトランスフェクションした細胞では、潜在型 M M P - 2 の 6 8 k D a のバンドのみが検出され、活性化に伴う分子量変化は観察されなかった（図 10 A）。C O S - 1 細胞では、潜在型 M M P - 2 発現プラスミド（ p S C G A ）をコトランスフェクションし、発現プラスミド由来の潜在型 M M P - 2 の活性化を観察したが、潜在型 M M P - 2 を構成的に発現する H T 1 0 8 0 でも同様に、 M T - M M P - 3 の発現に伴う潜在型 M M P - 2 の活性化が観察された。この H T 1 0 8 0 で観察された活性型 M M P - 2 は、細胞を 1 0 0 μg / ml のコ

ンカナバリン A で処理して誘導される活性型 M M P - 2 分子と同じ分子量を示し、また抗 M M P - 2 モノクローナル抗体と特異的に反応した。この活性化は、ベクター単独をトランスフェクションしたコントロールでは観察されなかった。一方、潜在型 M M P - 9 は、コントロールの細胞と同様に分子量の変化は認められず、活性化は認められなかった。T I M P - 1 と M T - M M P - 3 、あるいは T I M P - 2 と M T - M M P - 3 をコトランスフェクションした細胞における潜在型 M M P - 2 の活性化は、何れも抑制された。その抑制の程度は T I M P - 2 をコトランスフェクションした細胞の方が、 T I M P - 1 の場合よりも顕著であり、この傾向は M T - M M P - 1 、 M T - M M P - 3 とも同様であった（図 10 B）。

【 0 0 9 6 】 本発明の態様のうちには、（A）潜在型 M M P - 2 の活性化能を有する M M P の一種であり且つ M T - M M P - 1 以外の潜在型 M M P - 2 活性化因子である天然の M T - M M P と実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩；（B）該タンパク質が M T - M M P - 3 またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つものであることを特徴とする上記（A）項記載のタンパク質；（C） C 末端領域に、配列表の配列番号： 2 の A 1 a<sup>561</sup> ~ P h e<sup>584</sup> で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有することを特徴とする上記（A）項又は（B）項記載のタンパク質；（D）配列表の配列番号： 2 で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有する M T - M M P - 3 またはその塩であることを特徴とする上記（A）～（C）項のいずれか一記載のタンパク質；（E）外因性 D N A 配列を原核生物において発現して得たものであるか、あるいは真核生物で発現させて得たものであることを特徴とする上記（A）～（D）項のいずれか一記載のタンパク質；（F）配列表の配列番号： 2 で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴とする上記（A）～（E）項のいずれか一記載のタンパク質；（G）上記（A）～（F）項のいずれか一記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩；（H）上記（A）～（F）項のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする核酸；（I）上記（B）～（D）項のいずれか一記載の M T - M M P - 3 をコードする塩基配列を有する D N A 遺伝子であることを特徴とする上記（H）項記載の核酸；（J）配列表の配列番号： 1 で表される塩基配列のうちオープンリーディングフレーム部分又はそれと実質的に同等な活性を有する塩基配列を有することを特徴とする上記（H）又は（I）項記載の核酸；（K）上記（H）～（J）項のいずれか一記載の核酸を含有することを特徴とするベクター；（L）上記（H）～（J）項のいずれか一記載の核酸又は上記（K）項記載のベクタ

(28)

特開平9-87299

53

ーを保有することを特徴とする形質転換体；(M) 上記(L) 項記載の形質転換体を増殖可能な栄養培地中で培養し、組換えタンパク質としてMT-MMP-3またはその塩を包含する上記(A)～(F) 項のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドを生成せしめることを特徴とするMT-MMP-3またはその塩を包含する上記(A)～(F) 項のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドの製造方法にも関連する。こうしたタンパク質又はその部分ペプチド、さらには核酸は標識され測定・検査などに用いるものであることもできる。

## 【0097】

【発明の効果】潜在型 MMP-2 の活性化能を有する MMP の一種であり且つ MT-MMP-1 以外の潜在型 MMP-2 活性化因子である天然の MT-MMP と実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩を得ることができ、さらにそのタンパク質をコードする核酸が得られたことで、癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療に関わる研究に有用な診断手段が得られることがになった。またその他の医学的生理学的用途に有用である。本発明は特にヒト癌細胞表層で特異的に発現している新規マトリックスメタロプロテアーゼ、それをコ\*

## 配列

GGCTCCTTAC CCACCCGGAG ACTTTTTTTT GAAACGAAAC TAGGGAGGGA GGGAGAGGGA	60		
GAGAGGGAGA AAACGAAGGG GAGCTCGTCC ATCCATTGAA GCACAGTTCA CT ATG	115		
Met			
1			
ATC TTA CTC ACA TTC AGC ACT CGA AGA CCG TTG CAT TTC CTG CAT CAT	163		
Ile Leu Leu Thr Phe Ser Thr Gly Arg Arg Leu Asp Phe Val His Ile			
5	10	15	
TCG GGG GTG TTT TTC TTG CAA ACC TTG CTT TGG ATT TTA TGT GCT ACA	211		
Ser Gly Val Phe Phe Leu Glu Thr Leu Leu Trp Ile Leu Cys Ala Thr			
20	25	30	
GTC TGC GGA ACG GAG CAG TAT TTC AAT GTG GAG GTT TGG TTA CAA AAG	259		
Val Cys Gly Thr Glu Glu Tyr Phe Asn Val Glu Val Trp Leu Glu Lys			
35	40	45	
TAC GGC TAC CTT CCA CCG ACT AGC CCC AGA ATG TCA GTC GTG CGC TCT	307		
Tyr Gly Tyr Leu Pro Pro Thr Ser Pro Arg Met Ser Val Val Arg Ser			
50	55	60	65
GCA GAG ACC ATG CAG TCT GCC CTA GCT GCC ATG CAG CAG TTC TAT CGC	355		
Ala Glu Thr Met Glu Ser Ala Leu Ala Ala Met Glu Glu Phe Tyr Gly			
70	75	80	
ATT AAC ATG ACA GGA AAA GTG GAC AGA AAC ACA ATT GAC TGG ATG AAC	403		
Ile Asn Met Thr Gly Lys Val Asp Arg Asn Thr Ile Asp Trp Met Lys			
85	90	95	
AAG CCC CGA TCC GGT GTC CCT GAC CAG ACA AGA CGT AGC TCC AAA TTT	451		
Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Glu Thr Arg Gly Ser Ser Lys Phe			
100	105	110	
CAT ATT CGT CGA AAG CGA TAT GCA TTG ACA GGA CAG AAA TGG CAG CAC	499		
His Ile Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly Glu Lys Trp Glu His			

(29)

特開平9-87299

55

56

115	120	125	
AAG CAC ATC ACT TAC AGT ATA AAG AAC GCA ACT CCA AAA GCA CGA GAC			547
Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile Lys Asn Val Thr Pro Lys Val Gly Asp			
130	135	140	145
CCT GAG ACT CGT AAA GCT ATT CGC CGT GCC TTT GAT GTG TGG CAG AAT			595
Pro Glu Thr Arg Lys Ala Ile Arg Arg Ala Phe Asp Val Trp Gln Asn			
150	155	160	
GTA ACT CCT CTG ACA TTT GAA GAA GTT CCC TAC AGT GAA TTA GAA AAT			643
Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr Ser Glu Leu Glu Asn			
165	170	175	
GCC AAA CGT GAT GTG GAT ATA CCC ATT ATT TTT GCA TCT GGT TTC CAT			691
Gly Lys Arg Asp Val Asp Ile Pro Ile Ile Phe Ala Ser Gly Phe His			
180	185	190	
GGG GAC AGC TCT CCC TTT GAT GGA GAG GGA GGA TTT TTG GCA CAT GCC			739
Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala			
195	200	205	
TAC TTC CCT CGA CCA CGA ATT CGA CGA GAT ACC CAT TTT GAC TCA GAT			787
Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp			
210	215	220	225
GAG CCA TGG ACA CTA CGA AAT CCT AAT CAT GAT CGA AAT GAC TTA TTT			835
Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Pro Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe			
230	235	240	
CTT GTC GCA GTC CAT GAA CTG GGA CAT GCT CTG GGA TTG GAG CAT TCC			883
Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser			
245	250	255	
AAT GAC CCC ACT GCC ATC ATG GCT CCA TTT TAC CAG TAC ATG GAA CAG			931
Asn Asp Pro Thr Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Gln			
260	265	270	
ACA CTT CAA CTA CCT AAT GAT GAT TAC AGG CAT CAG AGA TAT ATG TCA			979
Thr Leu Gln Leu Pro Asn Asp Asp Tyr Arg His Gln Arg Tyr Met Ser			
275	280	285	
CCT GAC AAG ATT CCT CCA CCT ACA AGA CCT CTA CCG ACA GTG CCC CCA			1027
Pro Asp Lys Ile Pro Pro Pro Thr Arg Pro Leu Pro Thr Val Pro Pro			
290	295	300	305
CAC CGC TCT ATT CCT CCG GCT GAC CCA AGG AAA AAT GAC AGG CCA AAA			1075
His Arg Ser Ile Pro Pro Ala Asp Pro Arg Lys Asn Asp Arg Pro Lys			
310	315	320	
CCT CCT CGG CCT CCA ACC GGC AGA CCC TCC TAT CCC GGA CCC AAA CCC			1123
Pro Pro Arg Pro Pro Thr Gly Arg Pro Ser Tyr Pro Gly Ala Lys Pro			
325	330	335	
AAC ATC TGT GAT GGG AAC TTT AAC ACT CTA GCT ATT CTT CGT CGT GAG			1171
Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Leu Ala Ile Leu Arg Arg Glu			
340	345	350	
ATG TTT GTT TTC AAG GAC CAG TGG TTT TCG CGA GTG AGA AAC AAC AGG			1219
Met Phe Val Phe Lys Asp Gln Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn Arg			
355	360	365	
GTG ATG GAT GGA TAC CCA ATG CAA ATT ACT TAC TTC TGG CGG GGC TTG			1267
Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Gln Ile Thr Tyr Phe Trp Arg Gly Leu			
370	375	380	385
CCT CCT AGT ATC GAT GCA GTT TAT GAA AAT ACC GAC GCG AAT TTT CTG			1315

(30)	特開平9-87299		
57	58		
Pro Pro Ser Ile Asp Ala Val Tyr Glu Asn Ser Asp Gly Asn Phe Val			
390	395	400	
TTC TTT AAA CGT AAC AAA TAT TGG GTG TTC AAG GAT ACA ACT CTT CAA	1363		
Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Val Phe Lys Asp Thr Thr Leu Gln			
405	410	415	
CCT GGT TAC CCT CAT GAC TTG ATA ACC CTT GGA ACT GGA ATT CCC CCT	1411		
Pro Gly Tyr Pro His Asp Leu Ile Thr Leu Gly Ser Gly Ile Pro Pro			
420	425	430	
CAT GGT ATT GAT TCA GCC ATT TGG TGC GAG CAC CTC GGG AAA ACC TAT	1459		
His Gly Ile Asp Ser Ala Ile Trp Trp Glu Asp Val Gly Lys Thr Tyr			
435	440	445	
TTC TTC AAG GGA GAC AGA TAT TGG AGA TAT AGT GAA GAA ATG AAA ACA	1507		
Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Met Lys Thr			
450	455	460	465
ATG GAC CCT CCC TAT CCC AAG CCA ATC ACA CTC TCG AAA GGG ATC CCT	1555		
Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro			
470	475	480	
GAA TCT CCT CAG CGA GCA TTT GTA CAC AAA GAA AAT GGC TTT ACC TAT	1603		
Glu Ser Pro Gln Gly Ala Phe Val His Lys Glu Asn Gly Phe Thr Tyr			
485	490	495	
TTC TAC AAG GAA CGA GTA TTG GAA ATT CAA ACA ACC AGA TAC TCA AGG	1651		
Phe Tyr Lys Glu Gly Val Leu Glu Ile Gln Thr Thr Arg Tyr Ser Arg			
500	505	510	
CTA GAA CCT CGA CAT CCA AGA TCC ATC CTC AAC GAT TTA TCG GGC TGT	1699		
Leu Glu Pro Gly His Pro Arg Ser Ile Leu Lys Asp Leu Ser Gly Cys			
515	520	525	
GAT GGA CCA ACA GAC AGA GTT AAA GAA GGA CAC ACC CCA CCA GAT GAT	1747		
Asp Gly Pro Thr Asp Arg Val Lys Glu Gly His Ser Pro Pro Asp Asp			
530	535	540	545
CTA GAC ATT GTC ATC AAA CTG GAC AAC ACA GCC AGC ACT GTG AAA GCC	1795		
Val Asp Ile Val Ile Lys Leu Asp Asn Thr Ala Ser Thr Val Lys Ala			
550	555	560	
ATA GCT ATT GTC ATT CCC TGC ATC TTG GCC TTA TGC CTC CTT GTC TTG	1843		
Ile Ala Ile Val Ile Pro Cys Ile Leu Ala Ile Cys Leu Leu Val Leu			
565	570	575	
GTG TAC ACT GTG TTC CAG TTC AAG AGG AAA CGA ACA CCC CGC CAC ATA	1891		
Val Tyr Thr Val Phe Gln Phe Lys Arg Lys Gly Thr Pro Arg His Ile			
580	585	590	
CTG TAC TGT AAA CGC TCT ATG CAA GAG TGG GTG TGATGAGGG TTTTTCTTC	1944		
Leu Tyr Cys Lys Arg Ser Met Gln Glu Trp Val			
595	600	604	
TTCTTTCTT TTGCAGGAGT TTGTGGTAAC TTGAGATTCA AGACAAGAGC TGTTATGCTG	2004		
TTTCCTAGCT AGGAGCAGGC TTGTGGCAGC CTGATTCGGG GCTGACCTT CAAACCAGAG	2064		
GGTTGCTTGG TCCTGCCACAT CAGTGAAAT ACACCATGG GGA	2107		

【0099】

【配列番号：2】

配列の長さ：604

配列の型：アミノ酸

配列

Met Ile Leu Leu Thr Phe Ser Thr Gly Arg Arg Leu Asp Phe Val His

-訂 31-

\* 配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ヒト

\*

(31)

特開平9-87299

59	60
1	5
His Ser Gly Val Phe Phe Leu Gln Thr Leu Leu Trp Ile Leu Cys Ala	
20	25
Thr Val Cys Gly Thr Glu Gln Tyr Phe Asn Val Glu Val Trp Leu Gln	
35	40
Lys Tyr Gly Tyr Leu Pro Pro Thr Ser Pro Arg Met Ser Val Val Arg	
50	55
Ser Ala Glu Thr Met Gln Ser Ala Leu Ala Ala Met Gln Gln Phe Tyr	
65	70
Gly Ile Asn Met Thr Gly Lys Val Asp Arg Asn Thr Ile Asp Trp Met	
85	90
Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Gln Thr Arg Gly Ser Ser Lys	
100	105
Phe His Ile Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Gln	
115	120
His Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile Lys Asn Val Thr Pro Lys Val Gly	
130	135
Asp Pro Glu Thr Arg Lys Ala Ile Arg Arg Ala Phe Asp Val Trp Gln	
145	150
Asn Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr Ser Glu Leu Glu	
165	170
Asn Gly Lys Arg Asp Val Asp Ile Pro Ile Ile Phe Ala Ser Gly Phe	
180	185
His Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His	
195	200
Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser	
210	215
Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Pro Asn His Asp Gly Asn Asp Leu	
225	230
Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His	
245	250
Ser Asn Asp Pro Thr Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu	
260	265
Gln Thr Leu Gln Leu Pro Asn Asp Asp Tyr Arg His Gln Arg Tyr Met	
275	280
Ser Pro Asp Lys Ile Pro Pro Pro Thr Arg Pro Leu Pro Thr Val Pro	
290	295
Pro His Arg Ser Ile Pro Pro Ala Asp Pro Arg Lys Asn Asp Arg Pro	
305	310
Lys Pro Pro Arg Pro Pro Thr Gly Arg Pro Ser Tyr Pro Gly Ala Lys	
325	330
Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Leu Ala Ile Leu Arg Arg	
340	345
Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Gln Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn	
355	360
Arg Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Gln Ile Thr Tyr Phe Trp Arg Gly	
370	375
Leu Pro Pro Ser Ile Asp Ala Val Tyr Glu Asn Ser Asp Gly Asn Phe	
375	390
Val Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Val Phe Lys Asp Thr Thr Leu	
395	400

(32)

特開平9-87299

61

62

405	410	415
Gln Pro Gly Tyr Pro His Asp Leu Ile Thr Leu Gly Ser Gly Ile Pro		
420	425	430
Pro His Gly Ile Asp Ser Ala Ile Trp Trp Glu Asp Val Gly Lys Thr		
435	440	445
Tyr Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Met Lys		
450	455	460
Thr Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile		
455	470	480
Pro Glu Ser Pro Gln Gly Ala Phe Val His Lys Glu Asn Gly Phe Thr		
485	490	495
Tyr Phe Tyr Lys Glu Gly Val Leu Glu Ile Gln Thr Thr Arg Tyr Ser		
500	505	510
Arg Leu Glu Pro Gly His Pro Arg Ser Ile Leu Lys Asp Leu Ser Gly		
515	520	525
Cys Asp Gly Pro Thr Asp Arg Val Lys Glu Gly His Ser Pro Pro Asp		
530	535	540
Asp Val Asp Ile Val Ile Lys Leu Asp Asn Thr Ala Ser Thr Val Lys		
545	550	555
Ala Ile Ala Ile Val Ile Pro Cys Ile Leu Ala Leu Cys Leu Leu Val		
565	570	575
Leu Val Tyr Thr Val Phe Gln Phe Lys Arg Lys Gly Thr Pro Arg His		
580	585	590
Ile Leu Tyr Cys Lys Arg Ser Met Gln Glu Trp Val		
595	600	604

【0100】

\* 鎖の数：一本鎖

【配列番号：3】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：20

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

\*

配列

SGNVVNGCGWG AYATMRTSAT

20

【0101】

※ 鎖の数：一本鎖

【配列番号：4】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：27

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

※

配列

YTCRTSNTCR TCRAARTGRR HRTCYCC

27

【0102】

★配列の型：アミノ酸

【配列番号：5】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：14

★40 配列の種類：ペプチド

配列

Gln Thr Arg Gly Ser Ser Lys Phe His Ile Arg Arg Lys Arg		
1	5	10
		14

【0103】

☆トポロジー：直鎖状

【配列番号：6】配列の長さ：14

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

☆

配列

Glu Glu Val Pro Tyr Ser Glu Leu Glu Asn Gly Lys Arg Asp		
1	5	10
		14

【0104】

50 【配列番号：7】

(33)

特開平9-87299

63

64

配列の長さ：18

配列の型：アミノ酸

配列

Pro	Thr	Ser	Pro	Arg	Met	Ser	Val	Val	Arg	Ser	Ala	Glu	Thr	Met	Gln
1							10							15	
Ser Ala															
18															

【0105】

【配列番号：8】

配列の長さ：14

配列

Thr	Leu	Gly	Asn	Pro	Asn	His	Asp	Gly	Asn	Asp	Leu	Phe	Leu
1													14

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のMT-MMP-3のアミノ酸配列と既知のMMPファミリー（MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11及びMT-MMP-1）のアミノ酸配列との相同意を比較し、ドメイン構造を示した図である。アミノ酸の表記は一般的な一文字表記に従い、プレ型のN末端をアミノ酸1位として番号を付した。

【図2】本発明のMT-MMP-3と既知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同意を比較した結果を図1に続けてアライメントとして示す。

【図3】本発明のMT-MMP-3と既知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同意を比較した結果を図2に続けてアライメントとして示す。

【図4】本発明のMT-MMP-3と既知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同意を比較した結果を図3に続けてアライメントとして示す。

【図5】本発明のMT-MMP-3と既知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同意を比較した結果を図4に続けてアライメントとして示す。

【図6】ノーザンプロット分析の結果の電気泳動写真を示す。

A：ノーザンプロット分析による各種ヒト組織中のMT-MMP-3 mRNAの発現を調べた結果を示したものである。

B：ノーザンプロット分析による各種ヒト培養細胞中のMT-MMP-3 mRNAの発現を調べた結果を示したものである。

【図7】MT-MMP-3 cDNAをCOS-1細胞中で発現させ、MT-MMP-3タンパク質を免疫沈殿法によりセルライゼート及びコンディション培地中より検出した結果の電気泳動写真を示したものである。MT-

\* トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：ペプチド

※配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※10 配列の種類：ペプチド

MMP-3タンパク質（64 kDa）、TIMP-1タンパク質（28 kDa）の位置をそれぞれ▲、△で示した。

【図8】MT-MMP-3のC末端の疎水性アミノ酸の連続配列がトランスメンブレンドメインとして機能していることを、TIMP-1／疎水性アミノ酸の連続配列の融合タンパク質を作製して検討した結果の電気泳動写真を示す。A：遺伝子工学的に作製した融合タンパク質をCOS-1細胞中で発現させ、セルライゼートとコンディション培地中より検出した結果を電気泳動写真で示したものである。

【図9】MT-MMP-3のC末端の疎水性アミノ酸の連続配列がトランスメンブレンドメインとして機能していることを、TIMP-1／疎水性アミノ酸の連続配列の融合タンパク質を作製して検討した結果を生物の形態を示す写真として示す。B：COS-1細胞中で発現させたTIMP-1／疎水性アミノ酸の連続配列の融合タンパク質を免疫蛍光染色により検出した結果を生物の形態を示す写真で示したものである。

【図10】MT-MMP-3の発現による潜在型MMP-2の活性化の様子をザイモグラフィーの結果の電気泳動写真で示す。

A：MT-MMP-3 cDNA及び潜在型MMP-2 cDNAをコトランスフェクションしたCOS-1細胞中の潜在型MMP-2の活性化を示した電気泳動写真である。

B：MT-MMP-3 cDNAをトランスフェクションしたHT1080細胞中の潜在型MMP-2の活性化及びこの潜在型MMP-2の活性化に及ぼすTIMP-1、TIMP-2の影響を示した電気泳動写真である。

【图 1】.

Signal Peptide		Pro-Peptide		Catalytic	
MH9FPPLILIFNG	-VVSISFP-	-ATLETOEQDIDVORYLEKTYNWLNDGROVEKRNSGPVV-EKLHQMEFFGLKIVTKCKP			
HEALMARGALTGPRLACCLLISHAA	-AP-	SPIIKPGDWPARK-TDEKLAVQYNTF-YCCPK-E SCN LFLVAKDTLKKPMOKKFCLP QTGDL			
MNSLP LIILQIACVAY	-	-LGDAJARGEDTNNLYQRTYKLLDVKQVFKVAKD GPVV-KKIRHQKE LGLEVIKGML			
MR-LTMCAVCAV	-	-CSAYP-----TPOEAGCMSGELNOAQDY-LKRYLVYDSTKNSWANAS-AKLKRMOKKFCLP			
MFS LKLTPFLLLLH	-	-PGSALP-----VSSKEKNTKTVQDYLEKTYOPLSNQYOST- KNGCTNIVWEKLEMOROFFGLNYTGKPE			
MSIMOPIVVIVLIVGCC	-	-YQI SKAAPP-----VPAF PRORSTQTLVPGDPRTRLTQDRLAETVYRGGTTRVAERGSEKSLSGPQLQKSLPPEIGE			
MNHHLFLVCLPV	-	-CSAYP-----LSGAKEEDSKNDIACQYKLEKTYNWLNDGROVEKRNSGPVV-KKIQCHQKTFEGTQKLU			
NAPAWLWSAARAALPMLLILLQPLLAHAP	-	-PWAHALPSSPAPATQCL-----PDVHLHAERGPQ-----			
MKFLLILQI-O-ATA	-	-SGALP-----LNSSISLEKRNVLFGEEYLEKTYOPLVTKKHYQKTFGRSPSOS-AAI IAMMOQFYGLNMTGKV			
MSPAPSRCLLPLTALASLGQSISFP	-	-EAMQOQYI PPGDILHTRDTSRPSOS-AAI IAMMOQFYGLNMTGKV			
MILLFTSGCRDLPWY	-	-HSGVFTQLTQLMLILCATYVGTEQFNVYEWLQKTCRTPPTP RSMVYRSAETMQ-SALAMOOQFYGLNMTGKV			
M.L...J...J.	-A. P-----	-L.Y.L.....			
Pro-peptide		Catalytic		IS-1	
DAETLKVVKPQRGGYDVAQ	-	-FVLTEGNRDMEQHILYRIENYTPDLP RAYDVHAEIEKAFOLM3NVTPLTETKV-----			
MMP-1	-YNFPRPDPWDKNQYDPAVAN	-YNFPRPDPWDKNQYDPAVAN-----	-SEGQADIM-----		
MMP-2	-DONTIETMRKPRCGNPDVAN	-DONTIETMRKPRCGNPDVAN-----	-ADGEADIM-----		
MMP-3	-DSDTLMMRPKRCGYDPVHGC	-DSDTLMMRPKRCGYDPVHGC-----	-YEGEADIM-----		
MMP-7	-NSR1EIMMRKPRCGYDPVAA	-NSR1EIMMRKPRCGYDPVAA-----	-YNGTADIM-----		
MMP-8	-NEETLDMMKPKPRCGYDPDSCG	-NEETLDMMKPKPRCGYDPDSCG-----	-YNGTADIM-----		
MMP-9	-DESATLKAATPRRCGYDPDLSR	-DESATLKAATPRRCGYDPDLSR-----	-YSRDADIV-----		
MMP-10	-DTDTLLEVMMRPKRCGYDPVGH	-DTDTLLEVMMRPKRCGYDPVGH-----	-YNGTADIM-----		
MMP-11	-APRASSALPAPRCGYDPDSP	-APRASSALPAPRCGYDPDSP-----	-YEADIM-----		
MMP-12	-DISTLMMRPKRCGYDPVLIH	-DISTLMMRPKRCGYDPVLIH-----	-NGRADIM-----		
MMP-11	-DADMKAARRPKRCGYDPDQTR	-DADMKAARRPKRCGYDPDQTR-----	-NGMADIM-----		
MTP-MMP-1	-KWHKHNTYIKNTPKQDGETKIA	-KWHKHNTYIKNTPKQDGETKIA-----	-YNGMADIM-----		
MTP-MMP-3	-DRTNTIDMMKPKPRCGYDQTR	-DRTNTIDMMKPKPRCGYDQTR-----	-FREPMHEKEQADIM-----		
Consensus	-D..T..L..MKRPRCGVPD...	-F...PG..PG..PG..	-V..C..ADIM		

【図2】

MMP-1	I S P R G D H R H N S P F D G P G I N L A H A F Q G P G I G G D A H F D E H E R W T N - I N F T E Y N -	211	
MMP-2	I N F G R E H E G G P F D K R G L L A H A F A P G P G I D E F D E L A T G E G O V R V K Y N G M A D G E Y C K F P F L N G K E Y S C T D T G R S D G F L F E S T T Y N F E K D G K	270	
MMP-3	I S P A V R E H E G G P F D P G P G N V L A H A F A P G P G I D E F D E L A T G E G O V R V K Y N G M A D G E Y C K F P F L N G K E Y S C T D T G R S D G F L F E S T T Y N F E K D G K	271	
MMP-7	I G F A R G A H G S Y P F D P G N T L A H A F A P G T G L G C D D A H F D E D E R W T D G S S L G N -	207	
MMP-8	I A F Y O R D H G N S C Y P F D P G N G L L A H A F O R G Q G I G G D A H F D E H E R W T N - I S A V N Y -	211	
MMP-9	I O F G D A H E G S C Y P F D K D G L L A H A F P G G I G G D A H F D E D E L A T G E G O V R V K Y N G M A D G E Y C K F P F L N G K E Y S C T D T G R S D G F L F E S T T Y N F E K D G K	267	
MMP-10	I S P A V E K H G S Y P F D G P G H S L A H A Y P G P G L Y C D I T H F D D E B K W T E - D A S G T N -	210	
MMP-11	I D F A R Y W D G D L I P F D S P G G I L A H A F P K K T H R E C D V H F D D E T M T G D Q G T D	208	
MMP-12	I V V P A R G A H G S Y H A F D E K G G I L A H A F G C G I C C D A H F D E D E F W T T - H S G G T N -	211	
MT-MMP-1	I F F A E G F H G S P T P D E G G I L A H A Y P G P N I G G D T H D S A E P W T V - R N E D I N -	237	
MT-MMP-3	I I F A S G F H E D S S P D E G G I L A H A Y P G P C I G S D T H D S A E P W T L G N P H D G -	237	
Consensus	I . F A . . . H G D . . P F D S P G G . L A H A F . P G P G I G G D A H F D . D E . W T . . . . . N . . . . .	300	
	Catalytic		
MMP-1	I G F C P H E A L F T M G G N A E G P C K F P F R Q G T S Y D S C T T E G D Y R D K K Y G F C P E T A M T V - G G N S E G A P C V P F T F L G N K Y E S C T I S A G R S	211	
MMP-2	I G F C P H E A L F T M G G N A E G P C K F P F R Q G T S Y D S C T T E G D Y R D K K Y G F C P E T A M T V - G G N S E G A P C V P F T F L G N K Y E S C T I S A G R S	369	
MMP-3	I G F C P H E A L F T M G G N A E G P C K F P F R Q G T S Y D S C T T E G D Y R D K K Y G F C P E T A M T V - G G N S E G A P C V P F T F L G N K Y E S C T I S A G R S	211	
MMP-7	I G F C P S E R L Y T R D G N A D G K P C Q P F T F Q G Q S Y S A C T T D G S D G Y R N C A T T A N Y D R D K I F G C P T R A D T V M G G N A E G L C V Y P F T F L G E K Y S C T C S E G R G	207	
MMP-8	I G F C P S E R L Y T R D G N A D G K P C Q P F T F Q G Q S Y S A C T T D G S D G Y R N C A T T A N Y D R D K I F G C P T R A D T V M G G N A E G L C V Y P F T F L G E K Y S C T C S E G R G	210	
MMP-9	I G F C P S E R L Y T R D G N A D G K P C Q P F T F Q G Q S Y S A C T T D G S D G Y R N C A T T A N Y D R D K I F G C P T R A D T V M G G N A E G L C V Y P F T F L G E K Y S C T C S E G R G	367	
MMP-10	I G F C P S E R L Y T R D G N A D G K P C Q P F T F Q G Q S Y S A C T T D G S D G Y R N C A T T A N Y D R D K I F G C P T R A D T V M G G N A E G L C V Y P F T F L G E K Y S C T C S E G R G	210	
MT-MMP-1	I M T - I M P - 1	208	
MT-MMP-3	I M T - I M P - 3	229	
Consensus	I Consensus	237	

(35)

特開平9-87299

【图3】

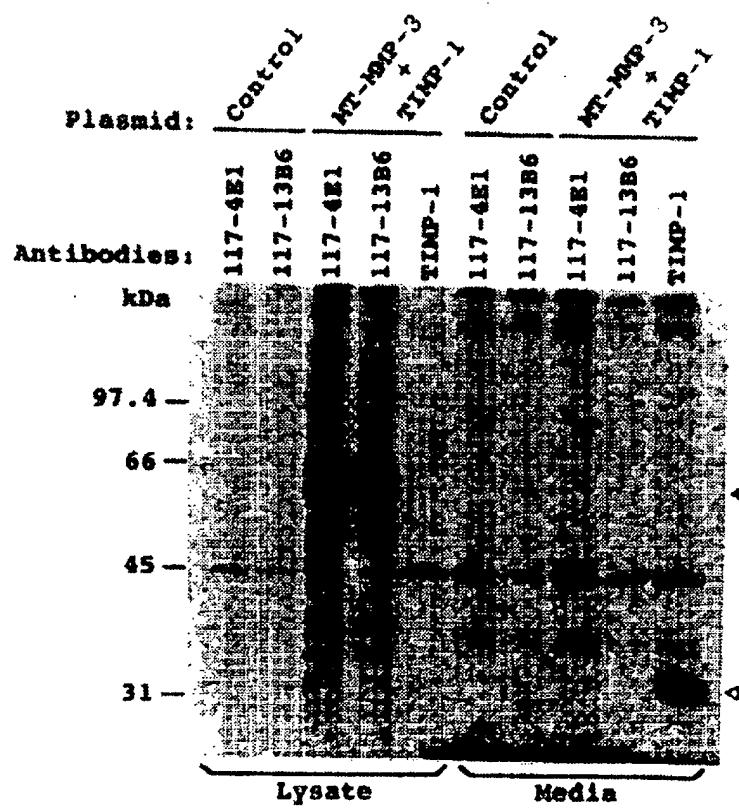
【図4】

【図5】

MMP-1	-----	469
MMP-2	-----	660
MMP-3	-----	477
MMP-7	-----	267
MMP-8	-----	468
MMP-9	-----	708
MMP-10	-----	476
MMP-11	-----	489
MMP-12	-----	470
MT-MMP-1	LLVLAVGLAVFFFRRHGTPRRLLYCORSLLDKV	582
MT-MMP-3	LCLLVIVYTVFQFKRKGTPRHILYCKRSMQEVV	604
Consensus	-----	833

【図7】

表面代用写真

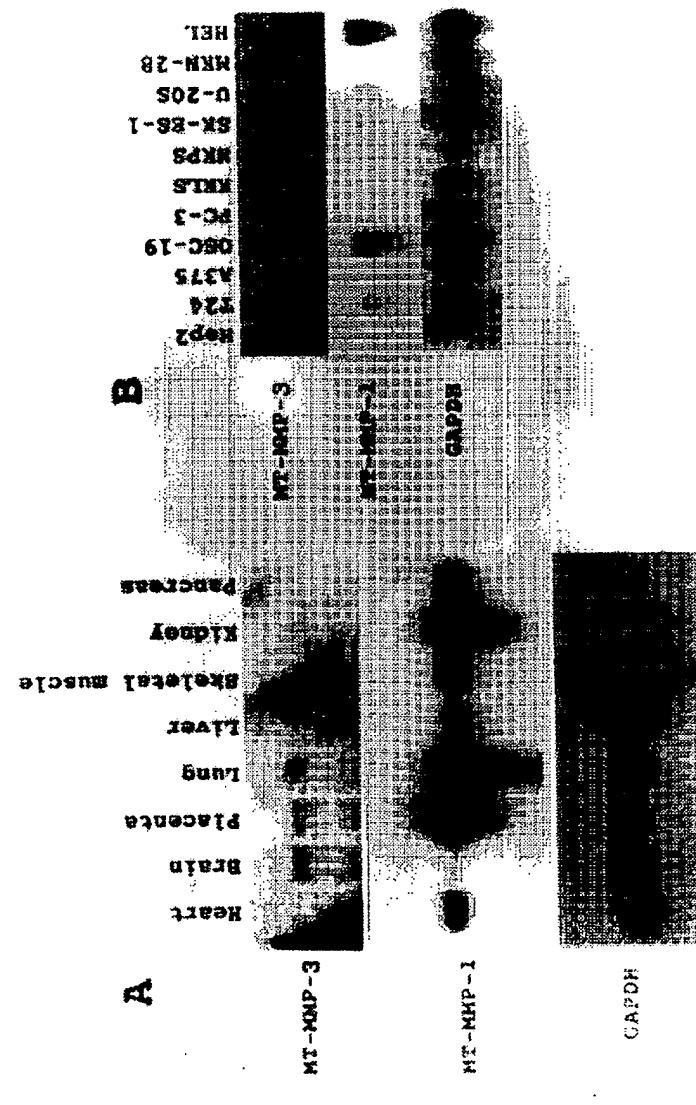


(37)

特開平9-87299

【図6】

## 図面代用写真

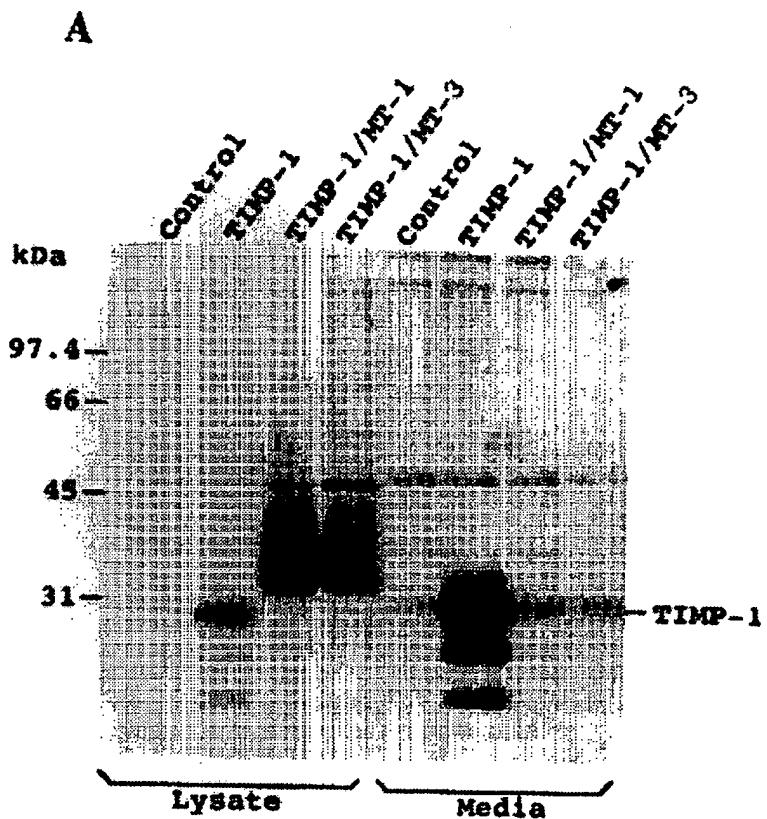


(38)

特開平9-87299

【図8】

図面代用写真

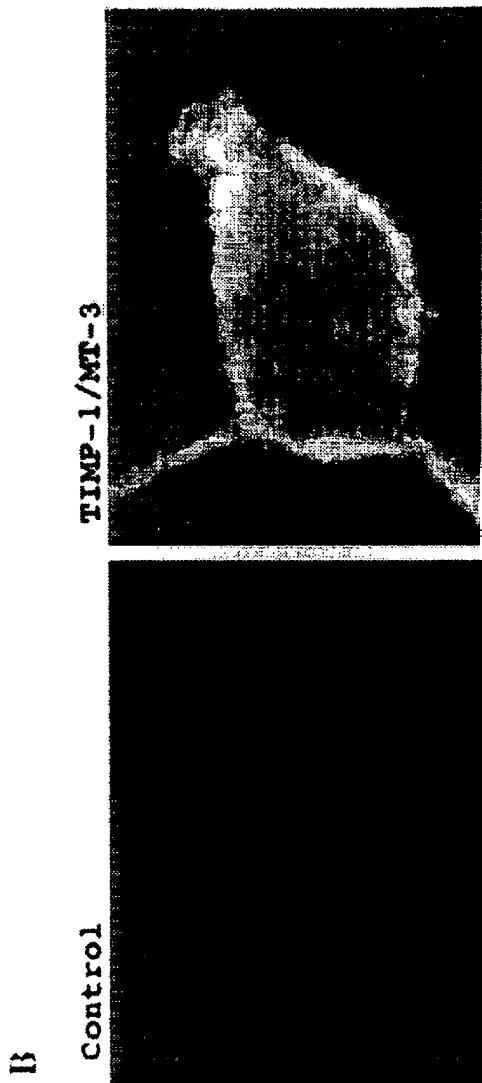


(39)

特開平9-87299

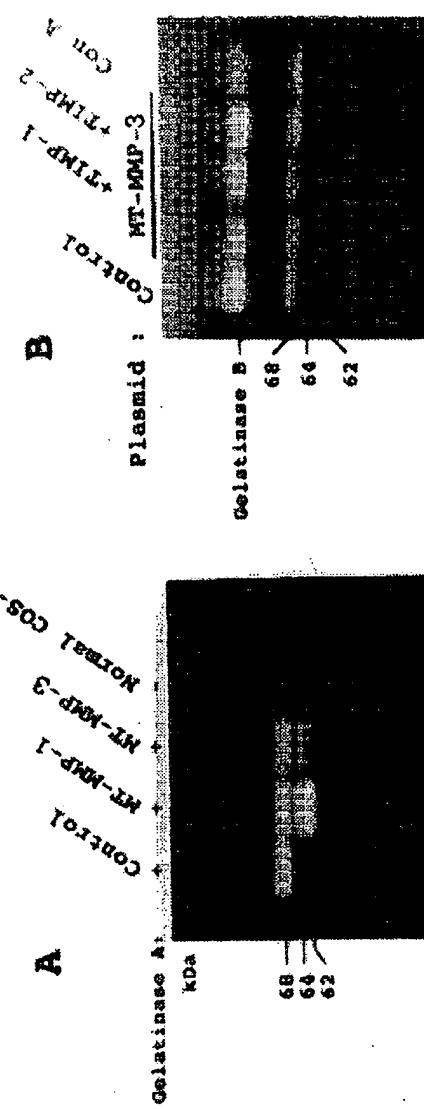
【図9】

図面代用写真



【図10】

図面代用写真



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号  
 C 1 2 P 21/08  
 C 1 2 Q 1/68  
 G 0 1 N 33/574  
 // A 6 1 K 38/46  
 C 1 2 N 9/64  
 C 1 2 P 48/00  
 C 1 2 N 39/395  
 A A M

F I		
G 0 1 N 33/577	B	
A 6 1 K 39/395	T	
48/00	A A M	
C 1 2 N 9/64	Z	
5/00	B	
15/00	C	
A 6 1 K 37/54	Z N A A	

(40)

特開平9-87299

(C 1 2 N 5/10  
C 1 2 R 1:91)  
(C 1 2 P 21/08  
C 1 2 R 1:91)



US 20010016333A1

(19) United States

(12) Patent Application Publication  
Seiki et al.(10) Pub. No.: US 2001/0016333 A1  
(43) Pub. Date: Aug. 23, 2001(54) NOVEL PROTEIN AND MONOCLOINAL  
ANTIBODY SPECIFIC THERETO

Jul. 14, 1995 (JP) ..... 7-200320

(76) Inventors: Motoharu Seiki, Shinagawa (JP);  
Hiroshi Sato, Kanazawa (JP); Akira  
Shinagawa, Takaoka (JP)**Publication Classification**(51) Int. Cl.<sup>7</sup> ..... C12P 21/02; C12P 21/08;  
C07H 21/04(52) U.S. Cl. ..... 435/69.1; 530/324; 435/70.1;  
435/320.1; 536/23.5

Correspondence Address:  
**WENDEROTH, LIND & PONACK, L.L.P.**  
Suite 800  
2033 "K" Street, N.W.  
Washington, DC 20006 (US)

(21) Appl. No.: 09/734,002

**(57) ABSTRACT**

(22) Filed: Dec. 12, 2000

A novel protein which is useful as diagnostic means for the studies relating to the diagnosis and treatment of cancer (detection of cancer cells, estimation of the malignity, etc.) and in other medicinal and physiological purposes; a gene encoding the same; and an antibody, in particular, a monoclonal antibody specific to the protein. MT-MMP-3, which is a pro MMP-2 activator having the ability to activate pro MMP-2 which is under expression specifically on the surface layer of a human cancer cell and falling within the category of MMP but being different from MT-MMP-1; a DNA containing the base sequence encoding the same; host cells transformed by the DNA; a process for producing a matrix metalloproteinase protein by using the host cells; a monoclonal antibody binding specifically to the matrix metalloproteinase protein; and use of the protein and antibody.

**Related U.S. Application Data**(62) Division of application No. 09/000,041, filed on Feb.  
20, 1998, now Pat. No. 6,191,255, which is a 371 of  
international application No. PCT/JP96/01956, filed  
on Jul. 12, 1996.**(30) Foreign Application Priority Data**

Jul. 14, 1995 (JP) ..... 7-200319